

Kraftkopplung in Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Doctor rerum naturalium)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
David Kirchenbüchler
aus
Olpe

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck

Tag der Promotion: 12.07.2011

Erscheinungsjahr: 2011

„An organism is so complex a thing, and growth so complex a phenomenon, that for growth to be so uniform and constant in all the parts as to keep the whole shape unchanged would indeed be an unlikely and an unusual circumstance. Rates vary, proportions change, and the whole configuration alters accordingly“

D'Arcy Wentworth Thompson 1917

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

David Kirchenbühler, Simone Born, Norbert Kirchgeßner, Sebastian Houben, Bernd Hoffmann und Rudolf Merkel, *Substrate, focal adhesions, and actin filaments: a mechanical unit with a weak spot for mechanosensitive proteins*, J. Phys.: Condens. Matter 22 194109, 18 November 2009

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, wie durch Verformung eines elastischen Substrates, Kraft in Zellen übertragen werden kann und an welchen Punkten diese Kraft in Zellen übertragen wird. Da sich eine eingeleitete Kraft nicht gleichmäßig im Substrat verteilt, wurden Bereiche mit hoher Krafteinleitung identifiziert und weiter charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss einer von außen eingeleiteten Dehnung, die Fokaladhäsionen fest mit dem Untergrund verbunden sind und dass die Kopplung, zwischen der Zelle und ihrer Umgebung, im Bereich der Fokaladhäsionen und den Stressfaserenden stattfindet. In diesem Bereich konnte eine plastische Verformung der Stressfaserenden beobachtet werden. Darüber hinaus konnte ausgeschlossen werden, dass diese Verformung durch Aktin-Polymerisation verursacht wird. Als Ergebnis der plastischen Verformung an den Enden und einer abnehmenden Gesamtspannung der Zelle, konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach einer Dehnung weniger Kraft ins Substrat einleiten können, als vor der Dehnung.

Der genaue Mechanismus bei der plastischen Verformung bleibt der klassischen Mikroskopietechnik verborgen. Um diese Strukturen auflösen zu können bedarf es einer hochauflösenden Mikroskopietechnik, wie sie zur Zeit in vielen Instituten entwickelt wird.

In diesem Zusammenhang wurde damit begonnen ein dSTORM-Aufbau zu etablieren. Bei dieser Mikroskopietechnik wird das stochastische Blinken von Fluoreszenzfarbstoffen ausgenutzt. Die Position einzelner Signale kann dabei sehr genau bestimmt werden. Die Summe dieser Positionen liefert ein Gesamtbild der abzubildenden Struktur, dessen Auflösungsgenauigkeit im Nanometerbereich liegt. Da diese Technik hochsensibel gegenüber verschiedenen Parametern, wie zum Beispiel dem Signal zu Rauschverhältnis und der Ausleuchtung ist, bedarf es einer genauen Kalibrierung eines jeden dSTORM-Aufbaus. In dieser Arbeit wurden Kontrollmessungen durchgeführt und Parameteränderungen simuliert, um den Grundstein für spätere Experimente zu legen, die ein genaues Bild von den Strukturen im Bereich zwischen Fokaladhäsionen und den Stressfaserenden liefern sollen. Darüber hinaus wurde ein Verfahren etabliert, durch das es möglich ist, die durch Thermik verursachte Bewegung der Probe zu erfassen, da diese im Bereich der Nanoskopie einen sehr großen Störfaktor darstellt. Hierzu wurden neben den klassischen Fluoreszenzfarbstoffen, die in späteren Experimenten zur Markierung der Strukturen in der Zelle dienen werden, auch fluoreszierende Kugeln auf die Oberfläche der Probe gebracht. Bei den anschließenden Aufnahmen können die Kugeln getrennt von dem anderen Farbstoff aufgenommen werden. Zudem wurde eine Software entwickelt, die es erlaubt mikroskopische Aufnahmen zeitnah zu analysieren, während gleichzeitig die thermische Bewegung der Probe kompensiert wird.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	11
1.1	Strukturen zur Bildung von Zellverbänden	12
1.1.1	Extrazelluläre Matrix	16
1.1.2	Zellverbindungen	17
1.1.3	Fokale Adhäsion	18
1.2	Myofibroblast	21
1.3	Elastizität und Steifigkeit	21
1.4	Lichtmikroskopie	22
1.4.1	Strahlengang im Mikroskop	23
1.4.2	Die Auflösung des Mikroskops	24
1.4.3	Fluoreszenzmikroskopie	26
1.4.4	Grundlagen der dSTORM (direct Stochastic Optical Recunstruction Mircroscopy)	27
1.5	Steuerung der Prozesse im Organismus durch mechanische Signale	29
1.5.1	Beeinflussung von Zellen in Kultur durch physikalische Signale	30
1.5.2	Krafteinfluss auf Strukturen innerhalb von Zellen	31
1.5.3	Der Mechanosensor	32
2	MATERIAL UND METHODE	35
2.1	Verwendete Lösungen und Geräte	35
2.2	Elastomer	38
2.2.1	Produktion von Zellkulturschalen mit und ohne Elastomer	38
2.3	Isolation kardialer Fibroblasten und Myozyten aus Herzen pränataler Ratten	40
2.4	Zellkultur	41
2.5	Plasmide	42
2.6	Transfektion	43
2.7	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	43
2.8	Dehnung des Elastomersubstrats	45

2.9	Positionsbestimmung von Bildstrukturen	46
2.10	Die durch die Zellen verursachte Deformation	47
2.11	Spezifische Färbung mittels Immunfluoreszenz sowie mit Phalloidin markierten Farbstoffen	48
2.12	dSTORM	49
2.12.1	Korrektur der durch Thermik verursachten Bewegung der Probe	49
2.12.2	Genauigkeit der Positionsbestimmung	50
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Charakterisierung von kreuzvernetzten Elastomersubstraten	55
3.2	Verbindung zwischen fokalen Adhäsionen und der EZM	57
3.3	Krafteinleitung von Zellen nach einer Dehnung	58
3.4	Stressfaser	60
3.4.1	Verhalten der Stressfasern während einer von außen eingeleiteten Dehnung	60
3.4.2	Die Stressfaserenden	62
3.4.3	Verlängerung der Enden der Stressfaser	64
3.4.4	Verformung der Stressfaserenden nach einer Dehnung	65
3.5	Die Prozesse an den Stressfaserenden können nicht aufgelöst werden	66
3.6	Simulation der Positionsbestimmung unter optimalen Bedingungen in der dSTORM	68
3.7	dSTORM Kontrollmessungen	69
4	DISKUSSION	72
4.1	Die FA sind fest mit der EZM verbunden	72
4.2	Die Kraft der Zelle nach einer Dehnung	73
4.3	Die Verlängerung der Stressfaser	74
4.4	Die Grundlagen der Verlängerung der Stressfaserenden	74
4.5	Die plastische Verformung der Stressfaserenden	75
4.6	Der molekulare Aufbau der Stressfaserenden	76

4.7 Ausblick	78
5 LITERATUR	80

1 Einleitung

Eines der beeindruckendsten Ergebnisse der Evolution, ist das Auftreten der *Metazoa*. Einzelne Zellen verbinden sich mit anderen Zellen oder mit der, sie umgebenden, extrazellulären Matrix. Form und Wachstum beeinflussen sich dabei gegenseitig. Bei größeren Populationen von Zellen bietet sich die Möglichkeit der Arbeitsteilung. Die Spezialisierung von einzelnen Gruppen innerhalb eines Organismus führt zu einer Erweiterung der Fähigkeiten. Die Entwicklung in einen stärker spezialisierten Zustand wird bei Zellen als Differenzierung bezeichnet. Molekular beruht die Differenzierung auf einer Auswahl der exprimierten Gene. Neben der Vielzelligkeit ist die unterschiedliche Differenzierung der Zellen ein herausstechendes Merkmal der *Metazoa*.

Die Verbindung zu einem vielzelligen Organismus wird dabei über sogenannte Zelladhäsionen vermittelt. Zelladhäsionen sind räumlich abgegrenzte Bereiche, in denen die Kopplung von Zellen zu ihrer Umgebung stattfindet. Um einen komplexen Organismus zu organisieren, mussten für die Kopplung spezifische molekulare Wechselwirkungen entstehen. Schwämme *Porifera* besitzen schon wichtige Vorläufer spezifischer Proteine der Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionen (Burke 1999) und der extrazellulären Matrix (Schütze et al. 2001).

Für ihre Funktionalität müssen Zellen ihr inneres Milieu konstant halten. In der Physiologie wird dieser Begriff als Homöostase bezeichnet. Zellen müssen ständig ihre Form genau kennen und den „Ist“-Zustand, dem „Soll“-Zustand anpassen. Physikalische Signale, wie Druck und Kraft, müssen von den Zellen gemessen und verarbeitet werden. Erst dadurch ist die Zelle in der Lage, ihre Form und Funktion zu steuern.

Für die Formgebung und Organisation von Zellen und Zellverbänden müssen mechanische Kräfte aufgewendet werden. Die Krafterzeugung bzw. Kraftübertragung geschieht dabei im Zytoskelett der Zellen. Die Kraftübertragung zwischen der Zelle und ihrer Umgebung wird hierbei über die Zelladhäsionen gewährleistet.

Physikalische Prozesse regulieren die Zusammensetzung, die Faltung und Synthese von Proteinen und schließlich die Funktion von Zellen. Welche Rolle dabei physikalische Kräfte spielen ist wichtig für unser Verständnis der Biologie der Zelle und wird einen tieferen Einblick in die grundlegenden Prozesse der Biologie gewährleisten (D. Discher et al. 2009).

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass einzelne Zellen einen „Tastsinn“ besitzen (Donald E Ingber 2006). Mechanische Prozesse steuern dabei epigenetische Veränderungen in den Zellen. Diese Prozesse sind entscheidend bei der Embryogenese, Differenzierung und der Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellen, Geweben und Organismen (D'arcy 1942).

In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass mechanische Reize in unterschiedlichen Zellbereichen molekulare Veränderungen auslösen können. Auf welche Weise diese lokalen Veränderungen zu einem mechanischen „Tastsinn“ der Zellen zusammengefügt werden, ist aber immer noch unklar (Donald E Ingber 2006). Aus diesem Zusammenhang heraus ist man bemüht,

die Knotenpunkte des „Tastsinns“ von Zellen und die daran gekoppelten Signalwege aufzuklären (C.S. Chen 2008).

1.1 Strukturen zur Bildung von Zellverbänden

Der Mensch besteht aus ca. 10^{13} Zellen. Ein Großteil ist fest untereinander verbunden und bildet durch festgelegte Positionen, Formen und Aufgaben einen funktionierenden Organismus. Dabei werden aus einem Fundus von Zelltypen die unterschiedlichsten Gewebe gebildet, welche auf sehr unterschiedliche Weise zusammengehalten werden. Die Verbindung der Zellen findet im Allgemeinen an räumlich genau definierten Bereichen in der Membran statt. Das Zytoskelett bindet an diese Bereiche und koppelt so das Innere der Zelle mit der Umgebung.

Zytoskelett

Um ihre Funktion ausüben zu können, müssen Zellen eine definierte Form annehmen. Diese Form wird über das Zytoskelett aufrechterhalten. Dabei muss die Zelle robust sein, um z.B. mechanische Spannung und/oder Dehnung standzuhalten. Gleichzeitig muss sie aber auch dynamisch sein, um auf Veränderungen reagieren zu können. All dies wird von dem Zytoskelett der Zellen gewährleistet.

Das Zytoskelett der Eukaryoten besteht aus Netzwerken, welche wiederum aus fadenförmigen Strukturen (Filamenten) aufgebaut sind. Alle Filamente werden dabei durch Polymerisation aus Untereinheiten gebildet. Das Zytoskelett besteht im Wesentlichen aus drei unterschiedlichen Komponenten, nämlich den Mikrofilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli.

Intermediärfilamente

In fast allen *Metazoa* sind Intermediärfilamente im Nukleus zu finden. Laminine bilden dort ein Gerüst (Senda et al. 2005). In *Vertebraten* finden wir außerhalb des Zellkerns eine weitere große Familie der Intermediärfilamente. Hier werden Strukturen im Zytoplasma der Zelle gebildet. Im Gegensatz zu Mikrofilamenten und Mikrotubuli sind diese Strukturen nicht für die Zellteilung und das Überleben der Zelle wichtig. Die Expression dieser Familie findet nur in wenigen Zelltypen statt.

Die Intermediärfilamente zeigen in vielen Zellen eine Interaktion mit anderen Teilen des Zytoskeletts. Die unterschiedlichen Komponenten des Zytoskeletts können dabei physikalisch verbunden sein. Die Verbindung kann bekannte Eigenschaften der anderen Netzwerke hinzufügen, aber auch ganz neue erschaffen (E. Fuchs 2001).

Mikrotubuli

Mikrotubuli kommen in allen Zellen der Metazoa vor. Ein Mikrotubulus ist ein Polymer aus dem Protein Tubulin. Tubulin ist ein Heterodimer aus einer α - und β -Untereinheit. Durch das ausgerichtete Anlagern von Tubulinen entsteht ein Protofilament. Einzelne Protofilamente

lagern sich zusammen und formen dabei eine hohle Röhre. Diese wird als Mikrotubulus bezeichnet. Die ausgebildete Röhre besteht normalerweise aus 13 Protofilamenten (Amos et al. 1979). Durch eine parallele Anordnung hat jeder Mikrotubulus ein Minus-Ende mit einem α -Tubulin und ein Plus-Ende mit einem β -Tubulin. Mikrotubuli sind typischerweise in Zellen mit ihrem Minus-Ende an ein Zentrosom gebunden, welches immer in Nukleusnähe zu finden ist. In der G1-Phase durchziehen Mikrotubuli, ausgehend vom Zentrosom, die ganze Zelle. Zur Krafterzeugung binden die Motorproteine Dynein und Kinesin an die Mikrotubuli. Motorproteine erzeugen Kräfte und können dadurch entlang der Mikrotubuli wandern (Vallee et al. 1990). Auf diese Weise werden die, an die Motorproteine gebundenen Zellkompartimente der Zelle, wie Vesikel, Chromosome oder Organellen (z.B. Golgi-Apparat oder das Endoplasmatische Retikulum) organisiert. Viele Gifte (z.B. Vinblastin, Paclitaxel) beeinflussen die Mikrotubuli und können somit die Zellteilung unterdrücken. Diese Eigenschaft der Gifte wird erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt (Blagosklonny et al. 1999).

Während Mikrotubuli von großer Bedeutung für die Homöostase von Zellen sind, zeigen sie aber kaum, bis keine direkte Interaktion mit Zelladhäsionen (Goldyn et al. 2009). Sie spielen daher bei der Interaktion von Zellen mit Zellen oder bei der Interaktion von Zellen mit der ECM nur eine untergeordnete Rolle.

Mikrofilamente

Die Mikrofilamente werden aus dem Protein Aktin geformt. Aktin kommt in allen eukaryotischen Zellen vor. Speziell beim Menschen findet man sie in sechs paralogen Varianten. Die Varianten unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren. Auch die Unterschiede zu anderen Organismen sind dabei sehr gering. Die Genfamilie ist bei den Eukaryoten hoch konserviert (Skarp et al. 2010). Als einzelnes Monomer hat Aktin eine Größe von ca. 42 kDa mit 374 bis 375 Aminosäuren und wird als G-Aktin (globuläres Aktin) bezeichnet. Aktin ist eine Adenosintriphosphatase und kann durch Polymerisation der Monomere, Filamente mit einem Durchmesser von 8 nm bilden (Fujii et al. 2010).

Aktinfilamente haben eine helikale Struktur, mit einem Gangunterschied von 37 nm. Sie lagern sich räumlich ausgerichtet an, besitzen somit eine Orientierung und haben ein Minus- und Plus-Ende. Dadurch entstehen Unterschiede im Polymerisationsverhalten der Enden. Der Prozess der Polymerisation ist einer der am besten regulierten Prozesse in der Zelle (Chhabra et al. 2007).

In der Zelle bildet F-Aktin sehr unterschiedliche Strukturen. In Muskelzellen wird die regelmäßige Struktur der Sarkomere gebildet (Ono 2010). In adhären Zellen liegt F-Aktin in verschiedenen Strukturen vor (Chhabra et al. 2007). Die Art der Vernetzung, kreuzvernetzt oder parallel, entscheidet dabei über die ausgebildete Struktur. In Zellen werden so dreidimensionale Netzwerke bis quasi zweidimensionale parallele Bündel gebildet.

Durch die Bewegung von Motorproteinen entlang eines Aktinfilaments können mechanische Kräfte erzeugt werden. F-Aktin kann von der Proteinfamilie Myosin gebunden werden. Myosin II kann durch Hydrolyse von ATP eine Bewegung entlang des Filaments ausführen (Manstein et al. 1989). Das Myosin II wandert gerichtet zum Plus-Ende des Filaments. Proteine aus der Myosin Familie können dabei fest mit anderen Strukturen verbunden sein und diese Strukturen entlang des Filaments bewegen.

Myosin II-Proteine liegen typischerweise gebündelt vor (Svitkina et al. 1989). Ein solches Bündel hat dadurch mehrere Enden, die sich entlang des F-Aktins bewegen können. Wenn sich mehrere Myosin II-Proteine entlang von unterschiedlichen Aktinfilamenten bewegen, werden die Filamente auf diese Weise aneinander vorbei bewegt.

F-Aktin kann auch parallel angeordnet sein und dadurch zu dickeren Filamenten gebündelt werden. Die Art und Weise wie eine Verknüpfung vermittelt wird, entscheidet über die Funktion solcher Bündel (K Weber et al. 1974). Die Vernetzung kann zum Beispiel durch kurze steife Proteine verursacht werden, wie z.B. Fimbrin (Bretscher et al. 1980). F-Aktin und Fimbrin bilden auf diese Weise ein dichtgepacktes Bündel. Diese Bündel befinden sich im Allgemeinen in Ausstülpungen der Plasmamembran, in sogenannten Filopodien. Dabei ist die Packungsdichte von F-Aktin so hoch, dass z.B. Myosin II nicht in solche Strukturen eindringen kann. Eine weitere Interaktion von F-Aktin mit kreuzvernetzenden Proteinen führt zu einer speziellen Bündelung des F-Aktins, welche nachfolgend genauer erläutert wird.

Stressfaser

Durch Bündelung mit α -Actinin (Lazarides et al. 1975) und der Einlagerung von Myosin (K Weber et al. 1974) entstehen sogenannte Stressfasern. Der Name beruht auf der Beobachtung, dass ein in Zellen auftretender mechanischer Stress, unter Kulturbedingungen, zur Ausbildung von langen graden Filamenten führt (Warren et al. 1924). Erst später bemerkte man, dass diese Strukturen selber kontrahieren können, also selber für einen mechanischen Stress in der Zelle verantwortlich sind (Kreis et al. 1980). Eine Stressfaser in migrierenden Zellen besteht aus 6 bis 65 Aktinfilamenten (Cramer et al. 1997). Der Grundaufbau einer Stressfaser beruht auf der Bündelung von F-Aktin über α -Actinin und dem Einbau von Myosin (Svitkina et al. 1989). Der genaue molekulare Aufbau kann dabei sehr unterschiedlich sein. Die größten Variationen im Aufbau zeigen migrierende Zellen der *Metazoa*, welche Stressfasern mit unterschiedlichem Aufbau und Verknüpfungen beinhalten (Small 1998). Die Enden können frei im Zytoplasma liegen oder mit Strukturen in der Zelle verbunden sein (Stricker et al. 2010). Die Polarität von F-Aktin innerhalb der Bündelung bestimmt die Bewegungsrichtung der Myosinproteine. Dieser Aufbau bildet die Grundlage für die Kontraktionsfähigkeit von Stressfasern. Nur dort, wo sich die Polarität von F-Aktin unterscheidet, führt die Bewegung von Myosin II Bündeln zu einer Kontraktion von F-Aktin (Kreis et al. 1980).

In stationären Zellen wechselt die Polarität von F-Aktin innerhalb einer Stressfaser regelmäßig. Die Stressfasern, die an beiden Enden mit fokalen Adhäsionen verbunden sind, haben dabei eine alternierende Abfolge von Myosin und α -Actinin. In migrierenden Zellen wird der Begriff Stressfaser ebenfalls verwendet. Ein Teil der Stressfasern hat hier dieselbe Polarität, die sich nicht regelmäßig ändert (Pellegrin et al. 2007). Diese Stressfasern hingegen zeigen fast gar keine Kontraktion (Chhabra et al. 2007).

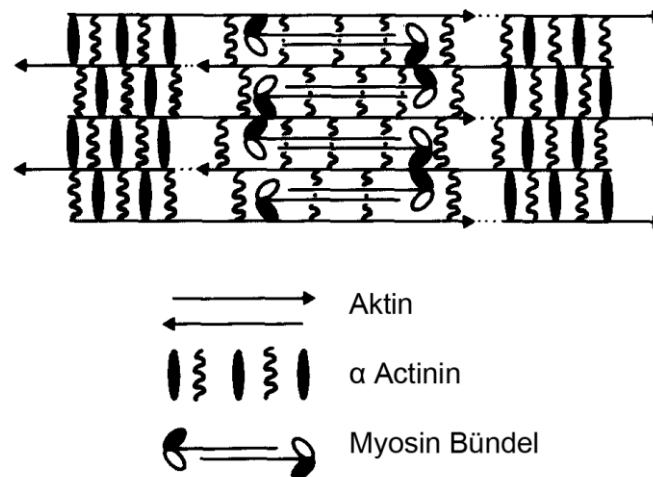


Abbildung 1. Schematischer Aufbau des inneren Teils einer Stressfaser. Maximale Länge von Myosin ca. 0.4 μm . Die Polarität der Aktinfilamente ist als Pfeil angedeutet. Verändert nach (Langanger et al. 1986)

Die Entstehung von Stressfasern in Zellen ist sehr unterschiedlich. In migrierenden menschlichen Osteosarkom Zellen (U2OS) werden Stressfasern auf verschiedene Weise innerhalb einer Zelle erzeugt, was auch die unterschiedliche Polarität von Stressfasern in diesen Zellen erklärt. Die Art der Kreuzvernetzung und die Möglichkeit der Kontraktion variiert hier somit mit der Position innerhalb der Zellen (Hotulainen et al. 2006).

In stationären Podozyten konnte gezeigt werden, dass Stressfasern nur von ihren Enden aus wachsen. Die Zusammensetzung und der Aufbau der Stressfasern wird hier durch ein kompliziertes Zusammenspiel aus Kraftübertragung und Kraftverteilung gesteuert (N. Endlich et al. 2007).

Die Spannung in den Stressfasern bestimmt die äußere Form der Zelle. Die Adhäsion verbindet die Zelle mit der EZM und die dazwischen liegenden Stressfasern arbeiten unter anderem gegen die Membranspannung. Zwischen den Adhäsionen ergeben sich die typischen konkaven Formen von Zellen auf einer Oberfläche. Die Spannung, die von den Stressfasern erzeugt wird, scheint in der Summe immer gleich zu sein (Théry, Pépin, et al. 2006).

Die mechanischen Eigenschaften von Stressfasern in Zellen sind nicht eindeutig geklärt. Bei der Betrachtung einer Stressfaser über die gesamte Länge ergeben sich unterschiedliche Bilder.

Wichtig für die Spannung und die Eigenschaften der Stressfasern scheinen der Anteil der Motorproteine und die unterschiedliche Kreuzvernetzung zu sein (Furukawa et al. 1997).

Oft werden die mechanischen Eigenschaften von F-Aktin mit denen eines steifen Kabels gleichgesetzt. Wenn an einem F-Aktin-Netzwerk gezogen wird, wird die Verschiebung ohne Verlust sofort übertragen (Heil et al. 2010). Beschrieben wurde auch ein mechanisches Verhalten von Stressfasern, das physikalisch zwischen dem eines steifen Kabels und einer Feder liegt. (Bischofs et al. 2008). Andere Studien haben gezeigt, dass wenn die mechanische Spannung innerhalb einer Stressfaser durch einen Schnitt gelöst wird, sich die Schnittkanten viskos und elastisch zurückziehen. Dieses Verhalten lässt sich durch eine Feder mit einem gekoppelten Dämpfungszyylinder beschreiben (Kumar et al. 2006).

Die beschriebenen mechanischen Eigenschaften einer Stressfaser reichen also von der eines Kabels bis zur Feder mit und ohne Dämpfungszyylinder. Dabei wurden unterschiedliche Teile einer Stressfaser betrachtet. Des Weiteren wurde dieses bei einer Erhöhung oder Erniedrigung der Spannung innerhalb der gesamten Stressfaser beschrieben.

In dieser Arbeit wurden nur Stressfasern analysiert, die eine regelmäßige Abfolge von Myosin und α -Actinin aufzeigen. Die Zellen sind vollständig ausgebreitet, so dass die beobachteten Stressfasern eine Spannung aufgebaut haben. Alle Ergebnisse müssen unter diesem Hintergrund betrachtet werden.

1.1.1 Extrazelluläre Matrix

Organismen bestehen nicht nur aus Zellen. In Bereichen zwischen den Zellen befindet sich die sogenannte extrazelluläre Matrix (EZM). Die EZM ist ein kompliziertes Netzwerk aus diversen Proteinen und Polysacchariden. Die Komponenten werden von den Zellen selber sekretiert. Die Zusammensetzung und die mechanischen Eigenschaften sind dabei sehr variabel (Fomovsky et al. 2010).

Durch das Ausbilden von vernetzten Strukturen bekommt die EZM ihre mechanische Stabilität. Netzwerke werden aus den Proteinfamilien der Kollagene, Fibrilline und Elastine gebildet (Vakonakis et al. 2007). Der Zwischenraum im Netzwerk wird durch andere Proteine oder Polysaccharide gefüllt. Eine Vielzahl von Proteinen vermittelt dabei die Adhäsion von Zellen an das Netzwerk. Eines der am besten charakterisierten Adhäsionsvermittler ist Fibronectin. Es besitzt viele unterschiedliche Bindungsstellen für die EZM, sowie für verschiedene Zelladhäsionsproteine. Fibronectin (FN) wird von einer Vielzahl an Zellen sekretiert und dient diesen als direkte Verbindung zur EZM (Mosher et al. 1981).

Die EZM steuert darüber hinaus wichtige Prozesse bei der Wundheilung und bei dem Wachstum des Hautepithels (Mousa 2008). Bei der Tumorerkrankung wird die EZM durch spezielle Enzyme (Metalloproteasen) zerstört (Vincenti et al. 2007). Die EZM ist nicht nur ein passives Substrat, in

welches Zellen eingebettet sind, sondern hat aktiven Einfluss auf fast alle Prozesse in der Zelle (Lukashev et al. 1998).

1.1.2 Zellverbindungen

Das Zytoskelett ist über die Zellmembran mit der EZM oder mit anderen Zellen verbunden. Die Intermediärfilamente und die Mikrofilamente binden direkt an diese Bereiche. Hieraus ergeben sich vier Kombinationen die im Weiteren im Detail erläutert werden.

	Zell-Zell Verbindung	Zell-EZM Verbindung
Mikrofilamente	Adherens Junctions	fokale Adhäsionen
Intermediärfilamente	Desmosome	Hemidesmosomen

Darüber hinaus gibt es noch andere mögliche Verbindungen, wie die „Gap junction“ oder die „Tight junction“. Keine von diesen interagiert jedoch direkt mit dem Zytoskelett der Zellen. Deswegen wird ihre Bedeutung bei der Kraftübertragung der EZM auf und von dem Zytoskelett als gering angesehen (Dejana et al. 1995).

Eine der vier, in der obigen Tabelle gezeigten, möglichen Verbindungen ist die „Adherens Junctions“. Diese vermittelt die Bindung von Zellen untereinander. Cadherine sind hier die Transmembranrezeptoren und binden im Zytoplasma an die Mikrofilamente. Im Allgemeinen bilden dabei die Mikrofilamente einen, die ganze Zelle umfassenden Gürtel aus. Diese Struktur findet man häufig in Epithelzellen. Sie führt zu einer erhöhten mechanischen Stabilität.

Wenn die Zell-Zell-Verbindungen im Zytosol an Intermediärfilamente binden, werden die Verbindungsstellen Desmosome genannt. Hier ist ebenfalls Cadherin das Transmembranprotein. Diese Verbindung kommt vermehrt in Zellen vor, die einer mechanischen Belastung ausgesetzt sind. Zum Beispiel sind Desmosome in Epithelzellen der Haut mit dem Intermediärfilament Keratin verbunden (Allen et al. 1996).

Intermediärfilamente können auch mit der EZM verbunden sein. Die Strukturen, die diese Verbindungen vermitteln, werden Hemidesmosome genannt. Als Transmembranrezeptor dienen hier nicht Cadherine, sondern Integrine. Epithelzellen sind zum Beispiel mit der Basallamina, einer stabilen Schicht aus EZM verbunden. Die mechanische Bedeutung wird bei Krankheiten deutlich, bei der diese Verbindung gestört ist. Als Beispiel kann die bullösen Pemphigoid genannt werden. Hier ist das Hautepithel nicht fest mit der Basallamina verbunden, wodurch es leicht zu einer Blasenbildung der Haut kommt (Dabelsteen 1998).

Die EZM kann auch über fokale Adhäsionen (FAen) mit Mikrofilamenten verbunden sein. Wie bei Hemidesmosomen bilden hier die Proteine der Familie der Integrine die Transmembranrezeptoren. Die Strukturen, welche aus den Mikrofilamenten gebildet werden, können durch ihre Kontraktion Kräfte auf die FAen übertragen (Lauffenburger et al. 1996).

In den hier beschriebenen Experimenten wurden einzelne Myofibroblasten analysiert, welche keinen Kontakt zu anderen Myofibroblasten hatten. Diese Zellen exprimieren keine Intermediärfilamente, welche Zytoplasma eine Struktur ausbilden, und die Verknüpfung mit der EZM findet ausschließlich über die FAen statt (Boris Hinz 2010). Die Zellen eignen sich daher im besonderem Maße um FAen und deren Verbindungen zu den Mikrofilamenten zu analysieren. Im Weiteren wird der Aufbau einer fokalen Adhäsion beschrieben.

1.1.3 Fokale Adhäsion

Fokale Adhäsionen sind 0,25 -1 µm breite und 1-10 µm lange Regionen. Sie haben einen Abstand zur EZM von 10-15 nm. In stationären Zellen befinden sie sich im allgemeinen in der Peripherie (Izzard et al. 1976).

Die Bindung der Zelle an die EZM erfolgt über die Integrin-Rezeptor-Familie. Auf der extrazellulären Seite binden Integrine verschiedene Proteine der EZM. Auf der zytoplasmatischen Seite bindet ein komplexes Netzwerk aus unterschiedlichen Proteinen, welches die Verbindung zu Mikrofilamenten herstellt.

Integrin

Zellen sind durch eine Plasmamembran begrenzt. Um die Innenseite mit der Außenseite mechanisch zu koppeln, muss diese von Proteinen durchquert werden. Ein Komplex, der diese Verbindung vermittelt, konnte aus der Zellmembran von Fibroblasten aus dem Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) isoliert werden. Der Komplex wurde wegen seiner zentralen Bedeutung der *Integrität*, der Zelle durch ihre Bindung an die EZM bis zum Zytoskelett, *Integrin* genannt (Tamkun et al. 1986).

Integrine bestehen aus zwei miteinander verbundenen Glycoprotein-Ketten. Beim Menschen werden aus den bisher bekannten 18 α- und 8 β-Untereinheiten 24 verschiedene Integrine aufgebaut (Richard O. Hynes 2002).

Integrine koppeln über nicht kovalente Bindungen an sehr unterschiedliche Strukturen der EZM. Dabei binden verschiedene Kombinationen von Integrinen zum Teil an sehr spezielle Strukturen. Einige Motive der EZM werden aber auch von ganz unterschiedlichen Integrin-Kombinationen erkannt und gebunden. Zum Beispiel wird die Aminosäuresequenz aus Agrinin, Glycin und Asparaginsäure, welche in vielen EZM Proteinen vorkommt (Fibronektin, Kollagen), von vielen verschiedenen Integrin-Kombinationen gebunden (Plow et al. 2000).

Integrine verbinden nicht nur die Zelle mit der EZM, sie dienen auch als Rezeptor. Mechanische und chemische Signale werden von ihnen detektiert. Integrine steuern so z.B. direkt die Proliferation der Differenzierung von Zellen (Giancotti 1999).

Die Oberfläche fast jeder Zelle beim Menschen präsentiert die Proteine der Integrin-Familie. Die Bindung an diese wird auch von einem breiten Spektrum von pathogenen Mikroorganismen wie

z.B. Viren genutzt (Stewart et al. 2007). Die Proteinfamilie ist daher von großer Bedeutung beim Menschen und kommt, mit der Ausnahme von Erythrozyten, in jeder Zelle vor.

Das Multiprotein Netzwerk der FA

Auf der zytoplasmatischen Seite der Integrine bindet ein Komplex, bestehend aus vielen verschiedenen Proteinen. Aktuell sind 156 Komponenten beschrieben, welche 690 Interaktionen eingehen. Jede Komponente geht im Mittel 8,66 Interaktionen ein (Projekt: „Focal Adhesion Network“). Die meisten dieser Interaktionen sind Bindungen der einzelnen Komponenten aneinander. Dabei vermittelt ein großer Teil dieser Komponenten die Bindung zu Mikrofilamenten. Eine Interaktion kann auch eine Modifikation, zum Beispiel durch Kinasen, darstellen. Die Abbildung 2 zeigt die außerordentliche Komplexität dieser Bindungen. Trotz der hohen Komplexität sind wichtige Knoten in diesem zu Erkennen, mit vielen Ein- und Ausgängen. Diese Art der Darstellung zeigt, dass Analysen einzelner Knotenpunkte immer in einem großen Zusammenhang betrachtet und interpretiert werden müssen.

Signale in Zellen werden biochemisch weitergeleitet und verarbeitet. Bei dieser Signaltransduktion sind oft eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen beteiligt. Die verschiedenen Signalwege bilden dabei eine Art Netzwerk. Diese Knoten haben im Allgemeinen sehr unterschiedliche Eingänge, aber wenige Ausgänge. Dieses führt dazu, dass unterschiedliche Reize dasselbe Signal in den Zellen ansteuern.

Die Phosphorylierung von Tyrosin steuert in der Signaltransduktion viele unterschiedliche Prozesse, wie z.B. Proliferation, Migration und Differenzierung (Lemmon et al. 2010). Tyrosinkinasen phosphorylieren zu diesem Zweck Proteine, die dann als sekundärer Botenstoff das Signal weiterleiten können. Einige Familien der Tyrosinkinasen bilden Knotenpunkte in der Signaltransduktion von Zellen. Verschiedene Kinasen phosphorylieren die gleichen Proteine. Die Aktivität der Tyrosinkinasen selbst, kann durch unterschiedliche Modifikation dieser beeinflusst werden. So entstehen Signalwege mit Abfolgen von Kinasen, welche wiederum Kinasen beeinflussen.

Auch bei der Signaltransduktion von mechanischen Reizen werden viele bekannte Signalwege benutzt. Ein Beispiel von Kinasen, die viele Rezeptoren besitzen, ist die Familie der Src-Tyrosinkinase. Sie wurde nach dem Protein v-src vom „*Rous Sarkom Virus*“ benannt (Parker 1981). Diese, von dem Virus eingebrachte Tyrosinkinase überstrahlt die Funktion, der in der Zelle vorkommenden Src-Familie. Durch die Fehlsteuerung der Zellen entsteht ein Bindegewebstumor. Eine Aktivität der Src-Familie wird sehr häufig in Zellen gefunden, die mechanisch gereizt werden. Viele Proteine der Signaltransduktion, wie Src Kinasen oder die FAK (fokale Adhäsions Kinase), sind in der FA zu finden (Benjamin Geiger et al. 2009).

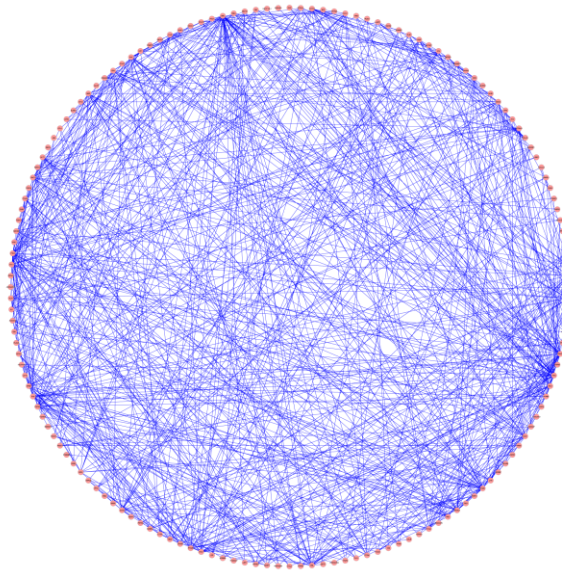


Abbildung 2. Funktionelles Netzwerk innerhalb einer FA. Jeder Punkt im Kreisrand ist eine Komponente. Die Verbindungen innerhalb des Netzwerks sind durch die blauen Geraden gezeigt. (Daten aus dem Projekt „Focal Adhesion Network“, Darstellung mit dem Programm „Cytoscape 2.8“)

Die Entstehung einer punktförmigen Adhäsion und ihre Reifung ist dabei ein sehr komplexer Vorgang. Hierbei wird eine fokale Adhäsion dynamisch aus den Komponenten aufgebaut. Manche Komponenten sind nur zeitweise in der fokalen Adhäsion zu finden, während andere Komponenten eines fokal Adhäsions-Gerüsts zu sein scheinen und immer Bestandteil dieser sind (Zaidel-Bar et al. 2004).

Als Beispiel sei eine wichtige Komponente von fokalen Adhäsionen, das Protein Vinculin, genannt. Es ist als Adapterprotein an der Bindung der fokalen Adhäsionen an die Stressfasern beteiligt (Benjamin Geiger et al. 1980). Vinculin besteht aus 1066 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 116 kDa (Singer 1982). Es hat einen globulären Kopf und eine Schwanzdomäne. Durch ein prolinreiches mittleres Segment kann das Protein verschiedene Konformationen annehmen. Die Kopfregion kann an Talin und α -Actinin binden und besitzt darüber hinaus eine Stelle, an der Tyrosin phosphoryliert werden kann. Die Schwanzdomäne bindet an F-Aktin und Paxillin. Die Konformation bestimmt dabei die Erreichbarkeit der Bindungsstellen (Coutu et al. 1988).

Eine weitere wichtige Komponente ist die Proteinfamilie VASP (Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein). Sie wurde zum ersten Mal bei der Blutgerinnung von Blutplättchen identifiziert. Hier stellen VASP Proteine ein Substrat von Kinasen dar, welche über zyklisches Adenosinmonophosphat reguliert werden (Goldmann et al. 2002). Eine Phosphorylierung von VASP hat eine Aggregationshemmung von Thrombozyten zur Folge. VASP bindet an Stressfasern und ist in Membranbereichen, wie auch in Filopodien oder Lamellipodien zu finden (Halbrügge et al. 1989). VASP kann darüber hinaus Aktinfilamente binden und bündeln (Price et al. 2000).

Wie Vinculin ist VASP ein gut vernetztes Protein, mit unterschiedlichen Aufgaben in der FA. In dieser Arbeit wurden gereifte fokale Adhäsionen betrachtet, um zu gewährleisten, dass der Auf- und Abbau über den Analysezeitraum sehr klein war.

1.2 Myofibroblast

Die Myofibroblasten wurde als Erstes in der Wundheilung beschrieben (Barzik et al. 2005). Morphologisch haben sie Eigenschaften von Fibroblasten, aber auch von glatten Muskelzellen. Wie Fibroblasten sind sie über fokale Adhäsionen mit der EZM verbunden. Ihre Stressfasern hingegen zeigen eine sehr regelmäßige Sakomerstruktur, wie sie bei glatten Muskelzellen zu finden ist. Bei einer Verletzung wandern unterschiedliche Zellen in den Wundverschluss ein und differenzieren dort zu Myofibroblasten (G. Gabbiani et al. 1971). Diese üben dort eine starke Kontraktion aus, die das Gewebe zusammenhält.

Myofibroblasten sind auch bei der Entwicklung von Organen wie der Lunge beteiligt. (Tomasek et al. 2002). Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wird über die Elastizität der EZM gesteuert. Dieses konnte sowohl im Organismus (M. Yamada et al. 2005), als auch in Zellkultur nachgewiesen werden (Boris Hinz et al. 2001).

Myofibroblasten eignen sich als Modellorganismus, um die Kraftübertragen in Zellen zu messen. Zum einen haben sie stabile Verbindungen zur EZM und üben messbare Kräfte auf ihre Umgebung aus, zum anderen reagieren sie auf Kräfte und Dehnungen, welche auf sie einwirken (J. Wang et al. 2003).

1.3 Elastizität und Steifigkeit

Elastomere verformen sich beispielsweise unter Druck. Bei ideal elastischem Verhalten nehmen diese nach der Belastung wieder ihre ursprüngliche Form an, wie z.B. eine Stahlfeder. Bei einem plastischen Verhalten wird der Körper irreversibel verformt, wie z.B. bei Ton.

Die mechanische Belastung wird in Spannung gemessen. Die Spannung (σ) ist Kraft (F) pro Fläche (A) und hat somit dieselbe physikalische Dimension wie der Druck. Der Druck stellt einen Spezialfall der mechanischen Spannung dar. Ein elastischer Körper erfährt eine Dehnung unter Spannung. Die mechanische Dehnung (ϵ) ist die relative Längenänderung eines Körper unter Belastung. Wenn sich die betrachtete Länge vergrößert, wird der Körpers gedehnt, wenn sich die Länge verkürzt, wird er gestaucht.

Der Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung eines Körpers wird über das Elastizitätsmodul ausgedrückt. Das Elastizitätsmodul (E) wird auch Youngscher Modulus genannt, nach dem Erfinder Thomas Young. Bildlich gesprochen gibt E an, welche Spannung benötigt wird, um die Länge eines Körpers zu verdoppeln.

Wenn E größer wird, steigt die Spannung an, die benötigt wird, um einen Körper zu verformen. Bei einem ideal elastischen Körper bleibt sein Volumen unter Dehnung erhalten. Die Poissonzahl ν beschreibt die relative Streckung $\Delta d/d$ zur relativen Stauchung $\Delta l/l$ eines Körpers unter Spannung, wobei d die Länge entlang der Kraft und l die Länge senkrecht dazu ist. Bei Volumenerhaltung eines elastischen Körpers unter Spannung ist $\nu = 0.5$.

Eine Formveränderung kann auch zeitlich verzögert zur Krafteinleitung eintreten. Dieses Verhalten wird als viskos bezeichnet. Das Verhalten kann dabei vollkommen elastisch sein. Die Zeit, die zum Erreichen des Gleichgewichtes benötigt wird ist hierbei z.B. frequenz- und temperaturabhängig. Je höher die angelegte Frequenz, umso länger dauert es einen Gleichgewichtszustand zu erreichen.

1.4 Lichtmikroskopie

Ein Mikroskop (*mikrós*: klein; *skopeîn*: betrachten) erlaubt es Strukturen darzustellen, welche unterhalb des Auflösungsvermögens des menschlichen Auges liegen. Die physikalischen Grundlagen der Vergrößerung können sehr unterschiedlicher Natur sein. Zum Vergrößern der Abbildung eines Objektes können z.B. Elektronen, Licht oder mechanische Abtastung verwendet werden. Zur Analyse von lebenden Zellen wurde hier die Lichtmikroskopie verwendet.

Licht ist eine elektromagnetische Welle, die senkrecht zur Ausbreitungsrichtung schwingt. Hierbei stehen elektrisches und magnetisches Feld senkrecht aufeinander und haben ein festes Größenverhältnis.

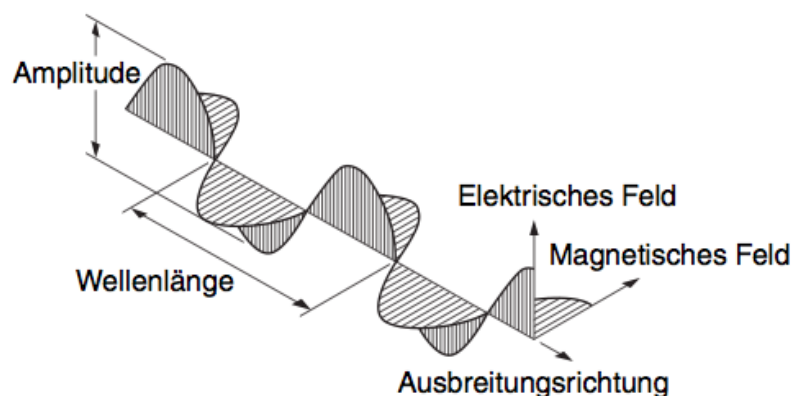


Abbildung 3. Schematische Ausbreitung von linear polarisiertem Licht. Die Schwingung des elektrischen sowie magnetischen Felds stehen senkrecht zueinander und zur Ausbreitungsrichtung. Entnommen aus (Hecht 2002).

Die Welleneigenschaften können durch die Amplitude (Intensität) und Wellenlänge (Energie) beschrieben werden. Die Strahleneigenschaften werden beschrieben durch die Ausbreitungsrichtung und die Geschwindigkeit. In der Optik werden die Welleneigenschaften

durch die Wellenoptik und die Strahleneigenschaften durch die sogenannte geometrische Optik behandelt. Das für den Menschen sichtbare Licht hat eine Wellenlänge von ca. 400 bis 700 nm. Dieses ist auch ungefähr der Bereich, der für die Lichtmikroskopie verwendet wird. Alle Eigenschaften des Lichts, wie Polarisation oder Wellenlänge usw., werden ausgenutzt, um Informationen über eine Probe zu sammeln. In der Fluoreszenzmikroskopie z.B. ist es möglich, durch Filtern von Wellenlängen, eingestrahktes und ausgestrahktes Licht zu trennen.

1.4.1 Strahlengang im Mikroskop

In der Lichtmikroskopie wird ein Objekt durch eine Linsensystem (Objektiv) vergrößert dargestellt. Um die Vergrößerung zu erhöhen, muss die Brennweite sehr gering gewählt werden. Bei hohen Vergrößerungen werden jedoch so geringe Brennweiten erforderlich, dass die Herstellung und Benutzung solcher Linsen gravierende Schwierigkeiten bereiten. In der Vergangenheit verursachte hier die unzureichende Fertigungstechnik die größten Probleme. Mit einer zweiten Linse (Okular) kann ein zuvor, von einem Objektiv erzeugtes, reelles und vergrößertes Bild betrachtet werden. Man gelangt so zum Prinzip des zweistufig arbeitenden "zusammengesetzten Mikroskops". Das Objektiv erzeugt hier ein vergrößertes und reelles Zwischenbild, das durch das Okular, auf die Netzhaut projiziert wird. Alle heute gängigen Lichtmikroskope arbeiten nach diesem wesentlichen Grundprinzip der zweistufigen Abbildung.

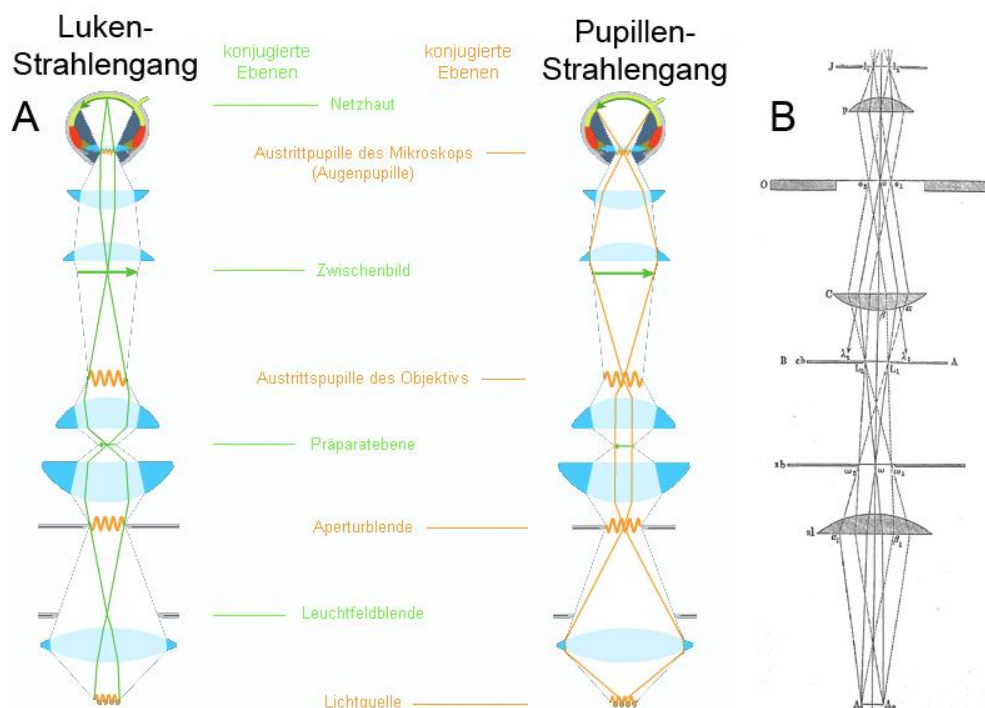


Abbildung 4. (A) Strahlengang im Mikroskop. Übernommen von Christian Linkenheld; basierend auf der (B) Originaldarstellung von August Köhler (August 1893). Die konjugierenden Ebenen zeigen an welcher Stelle sich reale Abbildungen der Lichtquelle bzw. des Präparats befinden.

Strahlengänge in einem Mikroskop lassen sich mit Hilfe der geometrischen Optik konstruieren. Hierbei wird zwischen zwei verschiedenen Abbildungsstrahlengängen unterschieden, je nachdem ob die Abbildung des Präparats oder die Abbildung der Lichtquelle betrachtet wird. Im Lukenstrahlengang wird das Präparat abgebildet, im Pupillenstrahlengang die Lichtquelle. Es sollte erwähnt werden, dass in der Abbildung 4 endliche Strahlengänge eines Mikroskops dargestellt sind. Heutzutage sind gängige Mikroskope bzw. Objektive auf einen unendlichen Strahlengang eingestellt. Die Strahlen verlaufen in diesem Fall nach dem Objektiv quasi parallel, das Bild wird im Unendlichen dargestellt. Eine weitere Linse (Tubuslinse) im Strahlengang führt dann wieder zu einer realen Abbildung im Endlichen. Der Bereich zwischen Objektiv und Tubuslinse ist der Bereich der sogenannten unendlichen Optik. Wegen der quasi parallelen Strahlenführung lassen sich dort optische Bauteile, wie Filter und Spiegel, problemlos einbringen. Bei nichtparalleler Strahlführung muss bei der Einführung von Filtern oder Spiegeln der Strahlengang aufwendig optisch korrigiert werden. An der grundsätzlichen Funktionsweise und den konjugierten Ebenen ändert dieses jedoch nichts.

1.4.2 Die Auflösung des Mikroskops

Die A , dass jedes Objekt durch Beugungseffekte abgebildet wird (Abbe 1873). Das bedeutet, dass die Bildinformation des Objekts auf die Beugungsfiguren aufgeteilt wird. Im Prinzip wird eine Objektstruktur im Bild erst dann aufgelöst, wenn die ersten Beugungsordnungen vom abbildenden System interferieren können. Abbe ging davon aus, dass die betrachteten Objekte inkohärente Lichtquellen sind. Dieses finden wir zum Beispiel bei selbststrahlenden Objekten.

Je mehr Beugungsordnungen des am Objekt gebeugten Lichts für

und der damit verbundene Informationsgehalt der Beugungsfigur. Somit bestimmt einzig die Anzahl der für die Interferenz zu Verfügung stehenden Beugungsordnungen die Auflösungsgrenze eines Mikroskops.

Ein Objektiv vergrößert ein Objekt und sammelt dabei aus einem festen Winkel das Licht. Dieser Winkel bestimmt wie viel gebeugtes Licht eingefangen werden kann, welches zur Interferenz beiträgt. Bei Luftobjektiven wird dieser Winkel über die Totalreflektion an der Grenzfläche von Deckglas bzw. Linsenglas (Brechungsindex ca. 1,5) zu Luft (Brechungsindex 1) limitiert. Luftobjektive haben somit ungefähr einen maximalen halben Öffnungswinkel (α) von 72° . Durch den Einsatz von optisch dichteren Medien zwischen Objektiv und Präparat, wird die Totalreflektion vermieden. Von dem Objektiv kann so Licht aus einem großen Winkel aufgefangen werden. Auf diese Weise tragen mehr Beugungsordnungen zur Bildgebung bei und erhöhen somit die Auflösung der abzubildenden Struktur.

Die Formel $d = \lambda(2n \cdot \sin(\alpha))^{-1}$ von Abbe beschreibt das Auflösungsvermögen von Mikroskopen. Hierbei steht „ λ “ für die Wellenlänge des verwendeten Lichts, „ n “ steht für den

Brechungsindex des Mediums zwischen dem Gegenstand und dem Objektiv und „ α “ beschreibt den halben Öffnungswinkel des Objektivs. Die Auflösung „ d “ definiert den Abstand, ab wann zwei Objekte gerade unabhängig von einander abgebildet werden können. Objekte, die einen geringeren Abstand zueinander haben, werden in der Bildgebung als ein Objekt dargestellt.

Das Produkt aus dem Sinus des halben Öffnungswinkels und dem Brechungsindex des Mediums ergibt die numerische Apertur $NA = n \cdot \sin(\alpha)$ von Objektiven bzw. Linsenssystemen. Die Auflösung wird somit von dem Öffnungswinkel des Objektivs und dem verwendeten Medium zwischen Objektiv und Deckglas und der verwendeten Wellenlänge beeinflusst, welche wiederum die Anzahl der für die Interferenz zu Verfügung stehender Beugungsordnungen beeinflussen. Je höher die NA eines Objektivs, desto feinere Strukturen können aufgelöst werden (Abbildung 5).

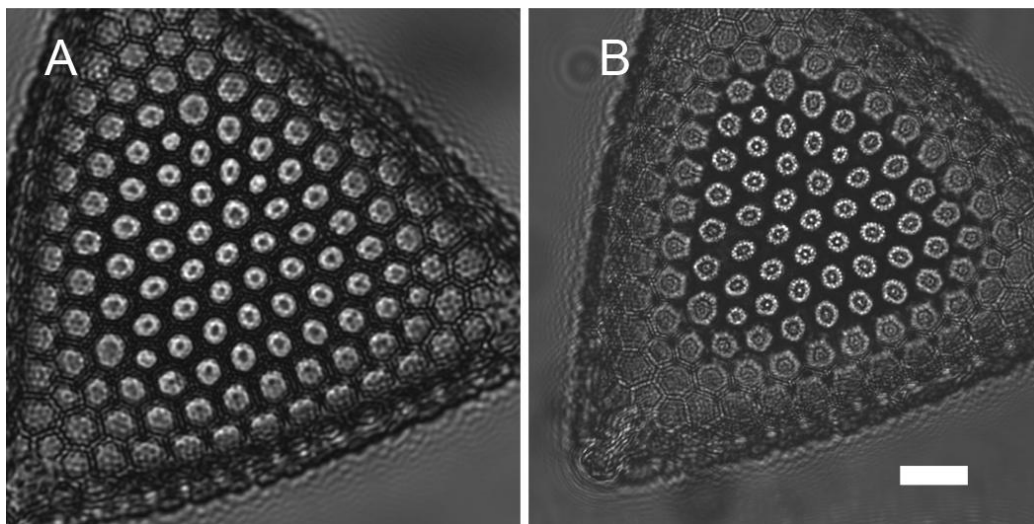


Abbildung 5. Mikroskopische Aufnahme einer Kieselalge (*Actinocyclus senarius*) aus der Nordsee mit unterschiedlichen Objektiven bei gleicher Bildpunktgröße (A) PlanNeofluar 25x/0,8 NA Luft. (B) Plan-Apochromat 63x/1,4 NA Öl. Maßstab = 10 μm .

Ein nahezu punktförmiges Objekt wird in einem Mikroskop als beugungsbegrenzter verwaschener Punkt abgebildet (Abbildung 6). Im beugungsbegrenztem Idealfall wird die Helligkeitsverteilung eines Punktes durch die Punktspreizfunktion (PSF) beschrieben. In drei Dimensionen entspricht Intensitätsverteilung, der Form einer rotationssymmetrischen Sanduhr. Das Intensitätsprofil hat Ähnlichkeiten mit einer Zigarre. Die Helligkeitsverteilung einer in der Mitte liegenden Scheibe, also ein zweidimensionaler lateraler Schnitt, kann näherungsweise durch die Form einer Gaußglocke beschrieben werden. Die Auflösung „ d “ entspricht der Halbwertsbreite eines Gaußprofils durch das Zentrum der zweidimensionalen PSF.

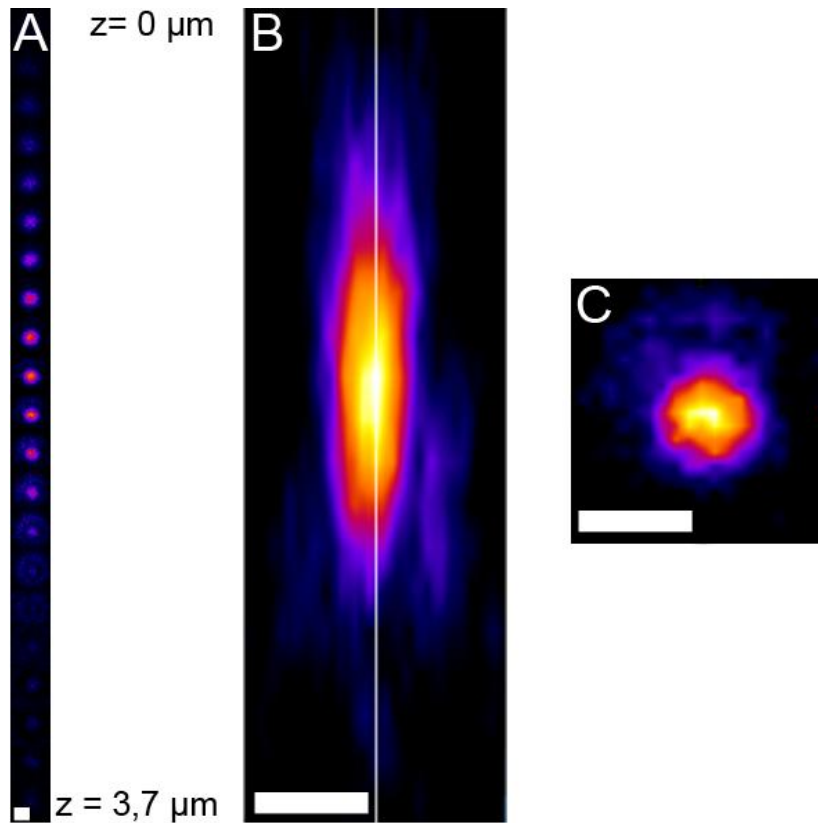


Abbildung 6. Dreidimensionale Abbildung in Falschfarbendarstellung einer PSF. Aufgenommen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (A) Abbild eines beugungsbegrenzten Punktes in unterschiedlichen Höhen von z (B) Abbild aller Bilder von A in den Koordinaten x und z, (C) und in den Koordinaten x und y. Maßstab 0,5 μm .

1.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Der Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie ist zu einer elementaren Methode der wissenschaftlichen Forschung geworden. Die größten Vorteile dieser Form der Mikroskopie sind die hohe Selektivität und Sensitivität (Coons et al. 1942). Die Moleküle werden durch die Absorption eines Photons in einen angeregten Singulettzustand überführt. Bei der Relaxation in den Grundzustand wird Energie frei. Wird diese Energie in Form von Licht ausgesendet, nennt sich dieser Vorgang Fluoreszenz. Strahlungslose Relaxationen im Singulettzustand reduzieren das Energieniveau. Die Emission ist dadurch, gegenüber der Absorption, zu höheren Wellenlängen verschoben (Stokesverschiebung).

Neben der Abstrahlung von Licht gibt es noch eine Vielzahl von anderen Zuständen, die von dem angeregten Zustand erreicht werden können. Durch die Änderung des Eigendrehimpulses der Elektronen wird der Singulett in einen Triplettzustand überführt. Dieser kann durch strahlungslose Relaxation oder durch elektromagnetische Abgabe (Phosphoreszenz) in den Grundzustand übergehen (Goldys 2009).

Fluorophore-Moleküle können darüber hinaus durch Anregungslicht photochemisch zerstört werden. Der Vorgang wird als „Bleichen“ bezeichnet. Das fluoreszierende Molekül verliert dadurch die Fähigkeit zur Fluoreszenz.

Der hohe Kontrast beruht auf der Tatsache, dass fluoreszierende Moleküle selber Licht abstrahlen. Die Moleküle müssen dafür mit Licht kürzerer Wellenlänge angeregt werden. Durch die Trennung von anregendem und abgestrahltem Licht, wird nur die Emission des fluoreszierenden Moleküls betrachtet. Dadurch ist das Hintergrundsignal, im Vergleich zum Signal sehr gering und es werden kontrastreiche Bilder erzeugt.

Die hohe Selektivität wird über eine Ankopplung des Fluoreszenzfarbstoffes an ausgewählte Strukturen (meist Proteine) gewährleistet. Eine spezifische Bindung wird mit einem fluoreszierenden Farbstoff verknüpft. Die Bindung von Proteinen erfolgt im Allgemeinen über spezifische Antikörper. Eine hochspezifische Bindung kann auch von kleinen Molekülen ausgehen, wie z.B. bei der Bindung von dem Gift des Knollenblätterpilzes (Phallotoxin) an F-Aktin. Durch die Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen wird eine hochspezifischen Färbung erreicht.

Eine wichtige Errungenschaft war die Entdeckung des „Grün-Fluoreszierenden-Proteins“ (GFP). Durch Fusion mit anderen Proteinen können diese im lebenden Organismus untersucht werden (Chalfie et al. 1994). In den letzten Jahren wurden verschiedene fluoreszierende Proteine entwickelt und mittlerweile ist der gesamte Bereich des sichtbaren Spektrums abgedeckt (Shaner et al. 2004). Die Fusionsproteine müssen von den zu beobachtenden Zellen nur noch exprimiert werden. Hierzu wird i.A. fremde DNS mit dem Fusionsprotein in die Zellen eingeschleust.

1.4.4 Grundlagen der dSTORM (direct Stochastic Optical Recunstruction Mircroscopy)

Viele Strukturen in einer Zelle sind kleiner als das Auflösungsvermögen konventioneller Lichtmikroskopie. Techniken, welche versuchen die Auflösung von Lichtmikroskopen zu verbessern, sind für die Biologie von großer Bedeutung. Viele grundlegende Prozesse in der Zelle finden in der Größenordnung von Nanometern statt. Als Beispiel seien die Bewegung von Proteinen der Myosin-Proteinfamilie entlang von Filamenten (Yildiz et al. 2005) oder die Ausbildung von Netzwerken mit F-Aktin genannt (Svitkina & Borisy 1999).

Wenn solche Strukturen dicht mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, erzeugen alle Markierungen einen beugungsbegrenzten Punkt. Bei gleichzeitiger Emissionen von zwei Punkten, die einen geringeren Abstand als die optische Auflösung haben, verwischen diese und können nicht mehr voneinander getrennt werden. Um solche Strukturen dennoch mit Hilfe der Lichtmikroskopie auflösen zu können, müssen die einzelnen beugungsbegrenzten Punkte voneinander getrennt werden.

Es gibt verschiedene Konzepte die es ermöglichen, zwei Punkte mit geringem Abstand, unabhängig zu beobachten, um dadurch eine verbesserte mikroskopische Auflösung zu

erreichen. Die damit erzielten Auflösungen, sowie die grundlegenden Techniken sind dabei sehr unterschiedlich (Schermelleh et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde eine Methode verwendet, bei der die Punkte selbst, zeitlich getrennt werden. Im einfachsten Fall von zwei Punkten, leuchtet zum Zeitpunkt $t=0$ nur einer der beiden, zum Zeitpunkt $t=t+\Delta t$ der andere. Die Position einzelner Punkte kann über das Anpassen einer Gaußfunktion an das Signal bestimmt werden. Mit dieser Technik ist es möglich, die Position auf wenige Nanometer genau zu bestimmen. Um einzelne Fluoreszenzfarbstoffe reversibel an- und auszuschalten, werden verschiedene Methoden eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde die dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) verwendet (Heilemann et al. 2008). Das statistische An- und Ausschalten wird hier über einen chemischen Prozess gesteuert. Organische Fluoreszenzfarbstoffe zeigen unter speziellen Bedingungen das Auftreten eines Zustandes, der nicht fluoresziert. Die genaue Photophysik dieser Zustände wird gerade intensiv erforscht (Steinhauer et al. 2008). Es scheint aber sicher zu sein, dass dieser aus dem Triplettzustand gebildet wird (Vogelsang et al. 2010). Dieser langlebige, nicht fluoreszierende „Aus“-Zustand wird durch eine Reduktion (Abgabe eines Elektrons) des Triplett-Zustandes erzeugt.

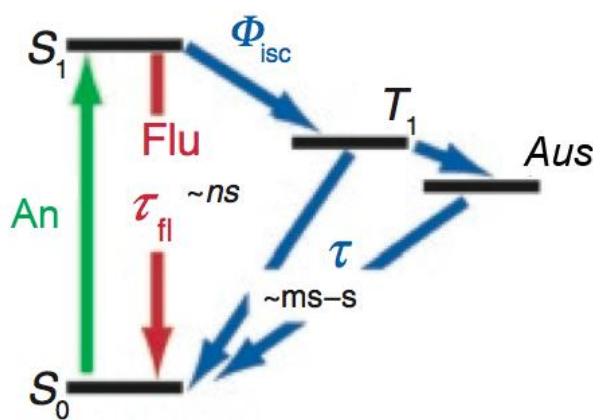


Abbildung 7. Zustände eines fluoreszierenden Farbstoffes bei Anregung (An) des Grundzustandes (S_0) zum Singulett-Zustand (S_1). Dieser kann zum einen, mittels Fluoreszenz (Flu), wieder in den Grundzustand übergehen, oder zum anderen in den Triplett-Zustand (T_1). Der T_1 kann in Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren in den „Aus“-Zustand (Aus) übergehen. Die Lebenszeit τ der unterschiedlichen Zustände sind dabei sehr unterschiedlich. Der „Aus“-Zustand hat dabei die längste Lebenszeit. Abbildung wurde verändert nach (Fölling et al. 2008).

Das dazu verwendete Reduktionsmittel sollte aber nur den etwas energieärmeren Triplettzustand reduzieren, nicht aber den energiereicheren Singulett-Zustand. Eine Reduktion des Singulettzustandes würde die Emission von Licht unterbinden, diesen aber nicht in einen „Aus“-Zustand überführen. Diese Fluoreszenzlöschung führt zu einer nicht gewollten Reduktion der Fluoreszenz. Im „An“-Zustand sollten genügend Photonen emittiert werden, damit genügend Signale zur genauen Positionsbestimmung erzeugt werden. Die Bestrahlungsintensität und die Konzentration des Reduktionsmittels steuern hier die Übergänge der einzelnen Zustände.

Darüber hinaus kann molekularer Sauerstoff, sowohl mit den angeregten Zuständen des Fluoreszenzfarbstoffes reagieren, was zu einer Fluoreszenzlöschung führt, als auch mit dem „Aus“-Zustand, was zur Folge hat, dass der „Aus“-Zustand wieder in den „An“-Zustand überführt wird (Heilemann et al. 2009). Molekularer Sauerstoff beeinflusst somit in Abhängigkeit der anderen Faktoren die Populationsdichten der einzelnen Zustände (Vogelsang et al. 2008).

Für das Experiment wurden Farbstoffe der Firma Atto-Tek und als Reduktionsmittel Monoethanolamin (MEA) verwendet. Nur die ionisierte Thiolgruppe am MEA kann den Triplettzustand reduzieren. Der pH-Wert in dem MEA (pKs 9,5 bei 25°C) gelöst ist, entscheidet über den Anteil des Reduktionsmittels, welcher den Triplettzustand in den „Aus“-Zustand überführen kann.

Der pH-Wert, die Bestrahlungsintensität, die MEA Konzentration und der gelöste Sauerstoff sind somit wichtige Komponenten, um die Populationsdichten der einzelnen Zustände zu kontrollieren.

Ein Experiment startet immer mit einer dicht markierten Struktur, in der alle Fluoreszenzfarbstoffe im Grundzustand sind. Bei einer Beleuchtung fluoreszieren somit alle Farbstoffe. Durch entsprechende Bedingungen (MEA, O₂ usw.) werden jetzt so viele Fluoreszenzfarbstoffe ausgeschaltet, dass eine Positionsbestimmung einzelner Farbstoffe ermöglicht wird. Über die Zeit werden statistisch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe an- und ausgeschaltet. Durch die Bestimmung aller Positionen über die Zeit wird ein Bild der Struktur erzeugt (Abbildung 8).

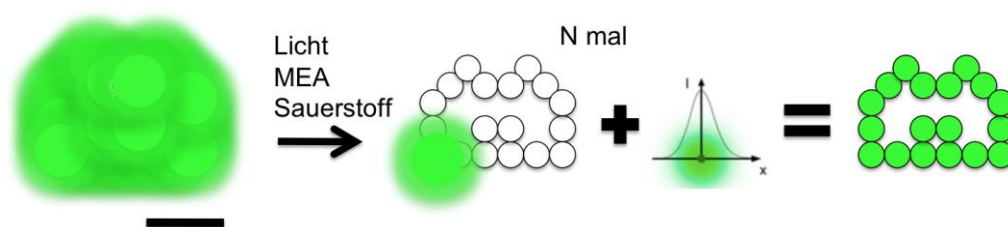


Abbildung 8. Prinzip der Hochauflösung mittels dSTORM. Am Anfang leuchten alle Fluoreszenzfarbstoffe mit der eine Struktur gefärbt wurde. Durch Überführen der meisten in den „Aus“-Zustand, leuchten nur noch sehr wenige. Von diesen wird die Position bestimmt. Durch viele Aufnahmen wird sichergestellt, dass möglichst viele Punkt einmal statistisch in den „An“-Zustand gewechselt haben und so lokalisiert wurde. Mit allen Positionen entsteht dadurch ein Bild mit verbesserter Auflösung. Maßstab 0,5 µm.

1.5 Steuerung der Prozesse im Organismus durch mechanische Signale

Die Embryogenese ist ein hochregulierter Prozess. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass auch hier mechanische Eigenschaften einen regulierenden Einfluss haben. In *in vitro* Experimenten wurden Vorläuferzellen aus den drei Keimblättern gelöst und anschließend gemischt. Es wurden gezeigt, dass die Zellen sich selbständig, in Abhängigkeit ihrer Steifigkeit,

sortieren. Die Steifigkeit ist dabei abhängig von der Aktin- und Myosinkonzentration in den Zellen. Die Spannung in den Zellen hat somit direkten Einfluss auf die Embryogenese (Krieg et al. 2008).

Die Umgebung von Zellen unterscheidet sich nicht nur in der chemischen Zusammensetzung, sondern auch in ihren physikalischen Eigenschaften. Zum Beispiel ist die Elastizität von Zellverbänden so gewebespezifisch, so variieren im menschlichen die Elastizitäten von Gewebetypen auf einer Skala von einigen Größenordnungen (Abbildung 9). Am weichesten ist dabei das Gewebe um die Neuronen mit einer Steifigkeit um die 1 kPa (Sharp et al. 2009). Die härtesten Gewebe wie Knochen mit bis zu 430 MPa (Goldstein et al. 1983) sind immer noch sehr weich, verglichen mit den normalen Zellkultursubstraten aus Plastik oder Glas mit ca. 50 GPa.

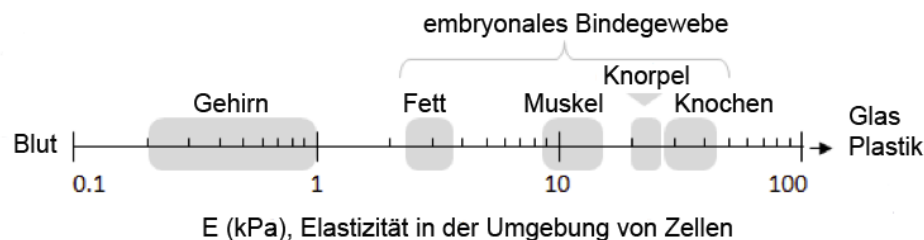


Abbildung 9. Elastizitäten von Geweben in Säugetieren unterscheiden sich um drei Größenordnungen. Abbildung verändert nach (Buxboim et al. 2010).

Viele Krankheitsbilder werden in der Medizin, basierend auf Veränderungen der Elastizität von Geweben, diagnostiziert. Tumore zeigen in den meisten Fällen eine viel höhere Steifigkeit als ihre Umgebung. Durch Sekretion wird die EZM aktiv von Tumorzellen verändert. Die erhöhte Steifigkeit führt über bekannte Signalwege wie *Erk* oder *Rho* zu einer weiteren Versteifung (Sui Huang et al. 2005). Tumore verändern auf diese Weise nicht nur ihre Umgebung, sie reagieren auch auf die mechanische Veränderung der Umgebung selbst. Somit entstehen Rückkopplungen, die bei der Bekämpfung von Tumoren beachtet werden müssen (Avvisato et al. 2007).

1.5.1 Beeinflussung von Zellen in Kultur durch physikalische Signale

Viele Experimente bezüglich des Verhaltens von Zellen auf physikalische Signale werden in Zellkultur durchgeführt. Die Zeitspannen, in denen Zellen reagieren, können dabei sehr unterschiedlich sein.

Die Konformation von Proteinen oder Kanälen ändert sich im Millisekundenbereich. Im Minutenbereich werden Kräfte und Komponenten in FAen oder Stressfasern verändert. Und im Bereich über Stunden kann die Zelle neue Proteine exprimieren und auf diese Weise ihre Differenzierung ändern.

Die Adhäsion an eine EZM ist für Zellen überlebenswichtig. Die meisten Zellen gehen in die Apoptose¹, wenn sie nicht adhären können. Die Unabhängigkeit von diesem Signal ist eines der Kennzeichen für Krebs (Hanahan et al. 2000). Die Bindung an die EZM ist ein grundsätzlicher Mechanismus, über den die Vitalität und das Wachstum von Zellen gesteuert wird (C.S. Chen et al. 1997).

Zellen können die Topographie ihrer Umgebung wahrnehmen. Der Phänotyp der Zellen ändert sich in Abhängigkeit davon, ob sie mit zwei- oder dreidimensionalen Umgebungen interagieren können. (Ochsner et al. 2010).

Die Geometrie der Adhäsionsbereiche von Zellen hat Einfluss auf die Zellen selbst. Die Position von Zellkompartimenten (z.B. Zellkern oder das Endoplasmatische Retikulum) wird dadurch beeinflusst. Die Geometrie innerhalb der EZM hat direkten Einfluss auf die Entwicklung von Zellen (Théry, Racine, et al. 2006).

Die Steuerung der Differenzierung wird maßgeblich von der Elastizität der EZM bestimmt. Die Reaktion auf die Elastizität überwiegt gegenüber der Reaktion z.B. auf gelöste Substrate, wie Wachstumshormone (Engler et al. 2006). Bei embryonalen Stammzellen ist die Differenzierung, das Überleben und Proliferation abhängig von der Kraft und Kontraktion der Zellen (G. Chen et al. 2010).

1.5.2 Krafteinfluss auf Strukturen innerhalb von Zellen

Die Entwicklung von punktförmigen Adhäsionen zu gereiften FAen ist ein hochregulierter Prozess (Zaidel-Bar et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung auch von einer externen Kraft, welche auf eine Adhäsion wirkt, beeinflusst wird. Bei einer der ersten Arbeiten wurden sehr kleine punktförmige Adhäsionen einer Kraft ausgesetzt. Dazu wurden Fibroblasten auf Glas kultiviert und die Membran, die über der fokalen Adhäsion liegt, mit einer Kanüle zurückgestrichen. Die Fläche der Adhäsion, markiert durch GFP-Vinculin, nimmt daraufhin zu. Es konnte gezeigt werden, dass einzelne junge Adhäsionen auf einen mechanischen Stress mit einem Wachstum reagieren (Daniel Riveline et al. 2001).

Weitere Experimente zeigen, dass das Wachstum der FAen von der Kraft gesteuert wird, die auf die Verbindungen wirkt, welche wiederum durch die FAen vermittelt wird. Erst eine Kopplung von EZM zur FA und zur Stressfaser ermöglicht es der Zelle, eine mechanische Kraft als Signal wahrnehmen zu können (C. G. Galbraith et al. 2002).

Experimente bezüglich der Dehnung von Zellen zeigten eine Einlagerung von Proteinen in die Stressfasern, welche im Allgemeinen in fokalen Adhäsionen vorkommen. Die Einlagerung ist abhängig von dem Protein Zyxin, welches typischerweise in der FA lokalisiert ist. Die

¹ Apoptose ist der programmierte und gesteuerte Zelltod.

Stressfasern werden durch Zyxin bei Dehnung zudem noch verstärkt, da sich Zyxin in den Stressfasern anlagert. Weitere Proteine aus der FA, wie z.B. VASP, werden bei einer Dehnung der Zelle in Stressfasern angereichert. Das ganze System, welches in der Zelle für die Krafterzeugung und die Kraftübertragung verantwortlich ist, kann externe Kräfte erkennen und darauf reagieren (Yoshigi et al. 2005).

Zellen reagieren auf mechanischen Stress mit einer Verstärkung und Umorientierung der Stressfasern. Bei Experimenten im Blutgefäßsystem von Tieren zeigen Stressfasern Unterschiede in Länge und Größe auf, abhängig von dem mechanischen Stress, welchen die Zellen erfahren. In Blutgefäßen von Tieren, konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass der alternierende Fluss eine entscheidende Rolle spielt (Kim et al. 1989).

Zellen in Kultur formen, unter Scherung mittels einer Strömung von Flüssigkeit, Stressfasern aus. Die Richtung und Größe der Stressfaser wird dabei über unterschiedliche Scherspannung beeinflusst (Franke et al. 1984).

Durch die Kultivierung von Zellen auf flexiblen Oberflächen können die Zellen aktiv gedehnt werden. Sie können dabei die Größe und die Richtung der Dehnung erkennen und ihr Zytoskelett danach ausrichten (Kaunas et al. 2006).

Zellen können sehr genau Kräfte und damit einhergehende Verformungen messen und darauf reagieren. Die Bandbreite, in denen mechanische Veränderung von Zellen gemessen werden können, ist dabei sehr groß. Es wird vermutet, dass einige grundlegende Prozesse für den „Tastsinn“ von Zellen vorhanden sind (Donald E Ingber 2006).

1.5.3 Der Mechanosensor

Die Auswirkung von mechanischen Reizen auf Zellen ist gut untersucht. Auch viele Signalwege, die dabei eine Rolle spielen, sind bekannt (Donald E Ingber 2006). Die grundlegenden Prozesse des mechanischen „Tastsinns“ sind aber weiterhin ungeklärt. Zur Zeit gibt es diverse Theorien, welche erörtern, welche Komponenten daran beteiligt sind (Benjamin Geiger et al. 2009). Darüber hinaus ist unklar, wie mechanische Reize in biochemische Signale umgeformt werden und schließlich in die Signalwege Einzug halten. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass dieser „Tastsinn“ nicht in einem speziellen Zelltyp vorkommt, sondern Bestandteil aller adhären Zellen ist.

Eine der am besten untersuchten mechanischen Sinne in Zellen sind die membranständigen Ionenkanäle. So führt z.B. eine mechanische Dehnung der Membran in Haarzellen des Innenohres, zu einer Öffnen der K^+ Kanäle. Diese Öffnung hat ein elektrisches Signal zur Folge (Bryant, Goodyear, & Richardson, 2002).

In Fibroblasten (NIH3T3) hat eine Dehnung der Zellen eine Öffnung der Ca^{2+} Kanäle in der Plasmamembran zur Folge. Dadurch strömt Ca^{2+} in die Zelle ein (Itano, Okamoto, Zhang, Lipton,

& Ruoslahti, 2003). Eine erhöhte Kalziumkonzentration kann die Zelle über nachgeschaltete Signalwege beeinflussen (Munevar, Y.-L. Wang, & Dembo, 2004). Das Öffnen von Kanälen durch mechanische Reize bietet der Zelle jedoch nicht die Möglichkeit, Kräfte, welche auf das Zytoskelett wirken, direkt zu messen. Eine Krafteinwirkung auf die Membran führt hier zu einer generellen Veränderung der Ionenkonzentration in Zellen.

Wie bei Ionenkanälen, kann sich auch bei nicht membranständigen Proteinen die Konformation, in Abhängigkeit einer mechanischen Kraft, ändern. Bei Zellen, die über FA mit der EZM verbunden sind, wurden viele solcher Proteine gefunden und charakterisiert. Sie sind alle Bestandteil der beteiligten Signal- und Kraftübertragung von Zellen (B. D. Matthews et al. 2006). In der EZM wurde z.B. eine kraftabhängige Konformation von Fibronectin nachgewiesen. Durch Krafteinwirkung werden im FN Bindungsstellen für Integrin freigelegt. (Engler et al. 2006). Durch FRET²-Sonden wurde gezeigt, dass FN eine, durch Zellkräfte verursachte, entfaltete Konformation annimmt. Der Zugang verschiedener Bindungsstellen im FN wird hierdurch verändert und kann somit Einfluss auf die Zelle nehmen (M. L. Smith et al. 2007).

Komponenten, die sich in der FA befinden, erfahren darüber hinaus eine Konformationsänderung in Abhängigkeit von Kräften. In diesem Zusammenhang ist das fokale Adhäsions-Protein p130Cas gut untersucht. Durch eine mechanische Dehnung *in vitro* sowie *in vivo* kann p130CAS von verschiedenen Proteinen der Src-Familie phosphoryliert werden. (Sawada et al. 2006). Dieser Prozess kann weitere Signalwege beeinflussen und ist in den FAen ein direkter Sensor für die mechanische Spannung.

1.1.1.1 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll geklärt werden, welche Komponenten einer Zelle durch eine von außen eingeleitete mechanische Dehnung beeinflusst werden. Es soll desweiteren der genaue Bereich der Kraftübertragung identifiziert und umfangreich analysiert werden. Da die molekularen Vorgänge in einem Bereich vermutet werden, dessen maximale Ausdehnung unterhalb der Auflösungsgrenze der klassischen Lichtmikroskopie vermutet wird, wurde in dieser Arbeit damit begonnen einen hochauflösenden dSTORM-Aufbau zu etablieren, von dem erwartet wird, dass er die nötige Auflösung liefert, um in zukünftigen Experimenten die Vorgänge auf molekularer Ebene aufzuklären. In diesem Zusammenhang sollen die Grenzen der neuen Mikroskopietechnik mit Hilfe von Kalibrierungsmessungen und Simulationen ermittelt werden. Desweiteren soll eine Methode etabliert werden, mit deren Hilfe es möglich ist, die ungewollte Bewegung der Probe, verursacht durch thermische Einflüsse auf die Bauteile im Mikroskop, zu messen, welche im Bereich der hochauflösenden Mikroskopie einen sehr großen Störfaktor darstellt. Darüber hinaus soll ein Programm entwickelt werden, welches während der

² Bei dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) kann ein mit Licht angeregter Donor seine Energie strahlungsfrei auf einen naheliegenden Akzeptor übertragen. Hiermit kann der Abstand zwischen Donor und Akzeptor bestimmt werden.

Datenaquisitionen Bilder, die mit der dSTORM aufgenommen werden, rekonstruiert und die, durch thermische Einflüsse ungewollte Bewegung der Probe, zeitgleich korrigiert.

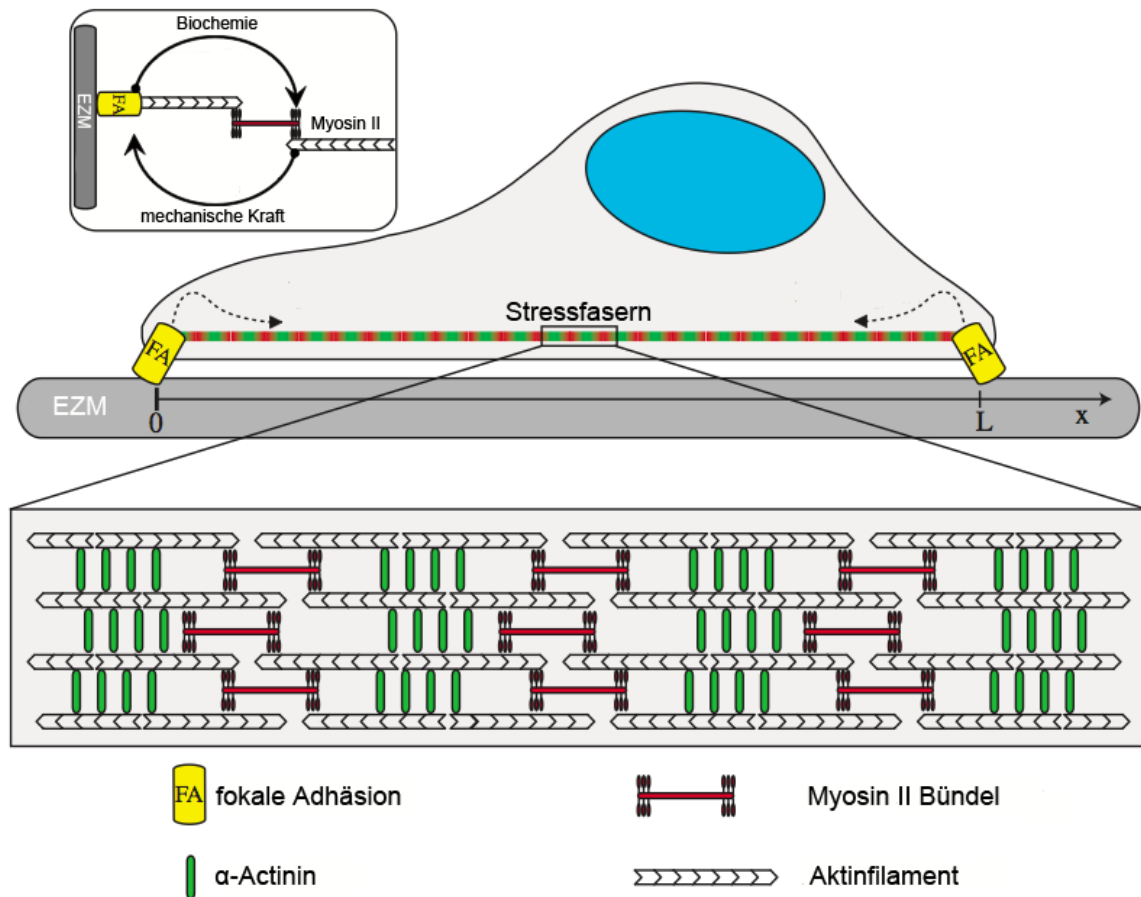


Abbildung 10. Zellen sind mit der EZM über fokale Adhäsionen verbunden, welche selber eine Verbindung zu den Stressfasern aufbauen. Die Stressfasern (vergrößert unten) erzeugen mit Hilfe von Myosin II eine Spannung. Eine Stressfaser wird über α -Actinin kreuzvernetzt. Eine mechanische Dehnung der Länge L wird in ein biochemisches Signal umgeformt (oben links), welches durch eine Rückkopplung wieder auf die erzeugte Kraft einwirkt. Die Abbildung wurde verändert nach (Achim Besser et al. 2007).

2 Material und Methode

2.1 Verwendete Lösungen und Geräte

Technische Geräte

Name (Abkürzung)	Typ	Hersteller / Ort
Sicherheitswerkbank	HS 12	Heraeus / Osterode
Begasungsbrutschrank	175	Thermo Scientific / Braunschweig
Zentrifuge	3-16K	Sigma / Taufenkirchen
Pumpe	RC6	Vacuubrand / Wertheim
Nukleofektor	Nucleofektor II	Amara / Köln
Mikromanipulator	MHW-3	Narishige / Japan Tokyo
NanoDrop	ND-1000	Peqlab / Erlangen
Heizplatte	RCT B	IKA / Staufen
Stereomikroskop	Stermi 2000	Zeiss / Jena
LSM 510 Meta	0000500124	Zeiss / Jena
LSM 710	2519000102	Zeiss / Jena
Wärmeschrank	UE 400	Memmert / Schwabach
Inkubator für LSM	Incubator XL3	Zeiss / Jena
Heizung für Inkubator	Heating Unit 1116-061	Zeiss / Jena
Steuergerät	Temp control 37-2 digital	Zeiss / Jena
Heizeinsatz	Heizeinsatz P	Zeiss / Jena
Matlab	Matlab Rel.7.2-9.4	MathWorks / München

Lösungen

Name (Abkürzung)	Typ oder Inhalt	Hersteller / Ort
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	H6648	Sigma / Taufenkirchen
Trypsin-EDTA Lösung (TE)	T 3924	Sigma / Taufenkirchen
Desoxyribonuklease II (DNase)	D8764	Sigma / Taufenkirchen
fötales Kälberserum(FKS)	FBS Superios	Biochroma AS / Berlin
ITS	I3146 100x	Sigma / Taufenkirchen
MM-	N6635 F10 Häm 17 mmol/l NaHCO ₃ pH 7,1 NaOH/HCl	Sigma / Taufenkirchen
Isopropanol	zur Analyse	Merck / Darmstadt

Name (Abkürzung)	Typ oder Inhalt	Hersteller / Ort
MM+	MM- 10% FKS 1:200 ITS 10,000 Units/l Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	Sigma / Taufenkirchen
Block Lösung	MM- und 30% FKS	-
Crimson	F-8806	Invitrogen / Darmstadt
Sylgard 184 (PDMS)	SYLGARD® 184 SILICONE ELASTOMER KIT	Dow Corning/ Wiesbaden
Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane (Trichlorosilane)	448931	Sigma / Taufenkirchen
LB Medium	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 10 g/l pH 7.0	alles von Sigma / Taufenkirchen
konzentriertes PBS (10x) bei der Verdünnung auf einfach konzentriertes PBS wird ein pH von 7,4 erreicht	NaCl 1,37 M KCl 27 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM KH ₂ PO ₄ 17.6 mM pH 6,8 eingestellt mit HCl/NaOH	alles von Sigma / Taufenkirchen
CB	NaCl 150 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 5 mM Glukose 5 mM MES(2(N-Morpholino)- Ethansulfonsäure pH 6,1 HCl/NaOH	alles von Sigma / Taufenkirchen
Fixierlösung	3,7% PFA in CB	Sigma /Taufenkirchen
Glycerol	G5516-1l	Sigma /Taufenkirchen
Triton x-100	T9284-500ml	Sigma /Taufenkirchen
Michpulver	Skim Milk Powder	Fluka / Oberhaching
Fibronektin	Fibronektin human Plazenta	BD Biosiencens / Fernwald
Rat Cardiomyocyte Neo Kit	VPE-1002	Lonza / Köln

Name (Abkürzung)	Typ oder Inhalt	Hersteller / Ort
Antikörper Vinculin	Monoclonal hVIN-1 IgG1	Sigma /Taufenkirchen
Antikörper sekundär 550/580	Anti Mouse Atto 550 43394-1ml-F	Sigma /Taufenkirchen
Phalloidin 488 Atto	A22282	Invitrogen / Darmstadt
Phalloidin 546 Alexa	A22283	Invitrogen / Darmstadt
Plasmid Kit	Mini Kit 12125	Qiagen / Hilden

Verbrauchsmaterial

Name (Abkürzung)	Typ	Hersteller / Ort
mittlere Zellkulturschale	60*14mm 628160	Greiner Bio-one / Solingen
Reaktionsgefäß 1.5 ml	Eppendorf Tubes	Eppendorf / Wiesbaden
Kanüle	Neolus Ø0.7 mm	Terumo / Eschborn
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved	LaborOptik / Bad Homburg
Deckglas 170 µm +-5 µm	0107052	Marienfeld / Lauda-Königshofen
Deckglas 80 µm	#00	Thermo Scientific / Braunschweig
fluoreszierende Kugeln 625/645 ø 0,2 µm	Crimson F8806	Invitrogen / Darmstadt
fusselfreie Tücher	Professional	Kimberly Clark / United Kinkdom

STORM Aufbau

Name (Abkürzung)	Typ	Hersteller / Ort
Olympus Mikroskop	IX71	Olympus / Münster
Dielektrischer Strahlteiler	Di01-R488/561	AHF / Tübingen
Bandpassfilter 523/610	F57-488 Dualband HC Sperrfilter 523/610	AHF / Tübingen
Laser 488	Innova 70C	Coherent / Dieburg
Laser 561	Sapphire 561-200CW	Coherent / Dieburg
Aufweitung	200mm AC254-200 -20mm AC254—20mm	Thorlabs / Karlsfeld
AOTF	AOTF-c-VIS-TN	AA Opto-electronic / Wallenhorst
Objektiv APON 60xOTIRF	APON60XTIRF	Olympus / Münster
Kamera EMCCD 512*512 Bildpunkte	iXon X3 x4877	Andor / USA South Windsor, Connecticut
fluoreszierende Kugeln 505/515 ø 0,2 µm	F8811	Invitrogen / Darmstadt

2.2 Elastomer

Zur Analyse lebender Zellen kann die Lichtmikroskopietechnik verwendet werden. Im Allgemeinen wird dazu ein inverses Mikroskop benutzt, um die Zellen von unten durch eine Glasschicht zu beobachten. Um Zellen auf unterschiedlichen Steifigkeiten zu untersuchen, muss auf dem Glas eine Elastomerschicht aufgebracht werden. Diese muss, wie das Glas selber, transparent sein. Darüber hinaus darf der Elastomer nicht toxisch sein und sollte sich in unterschiedlichen Steifigkeiten produzieren lassen. Elastomere aus kreuzvernetzten Polydimethylsiloxane (PDMS) haben all diese Eigenschaften.

Zur Herstellung eines Elastomers wurde SYLGARD® 184 SILICONE ELASTOMER KIT von Dow Corning benutzt. Dazu wurde die Grundsubstanz, bestehend aus einem Siloxanoligomer mit endständigen Vinylgruppen, mit einem Kreuzvernetzer aus einem Siloxanoligomer, welcher mindestens drei Silizium-Hydride enthält, vermischt. Die Grundsubstanz enthält noch einen Platin-Katalysator, welcher das Aushärten des Elastomers vermittelt. Durch Hydrosilylation der Doppelbindung am Silizium entsteht eine kovalente Bindung zwischen den Vinylgruppen der Grundsubstanz und den Silizium-Hydriden des Kreuzvernetzers, welche zu einer Si-CH₂-CH₂-Si Verbindung zwischen Grundsubstanz und Kreuzvernetzer führt. Durch die Vielzahl von Reaktionsstellen im Kreuzvernetzer bildet sich ein dreidimensionales Netzwerk aus. Das Verhältnis von Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer bestimmt hierbei die Eigenschaften des Elastomers. Wenn weniger Kreuzvernetzer im Verhältnis zur Grundsubstanz verwendet wird, werden weichere Elastomere erzeugt.

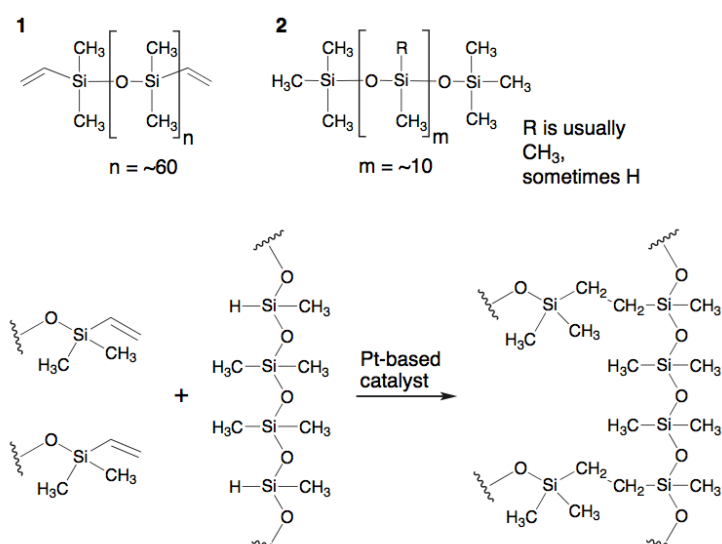


Abbildung 11. Der Kreuzvernetzer (1) enthält Siloxan-Oligomere mit endständigen Ethenylgruppen. Die Grundsubstanz (2) hat wenige Vinylgruppen im Siloxan-Oligomer und zusätzlich einen Platin-Katalysator. Wenn (1) und (2) gemischt werden, kommt es zu einer organometallisch vermittelten Kreuzvernetzung zwischen den Methylgruppen und den Ethenylgruppen. Abbildung entnommen aus (Lisensky et al. 1999)

2.2.1 Produktion von Zellkulturschalen mit und ohne Elastomer

Aktuelle Objektive für die Mikroskopie, mit hohen numerischen Aperturen, sind im Allgemeinen auf eine Deckglasdicke von 170 µm, bei einer optischen Dichte von ca. 1,5, korrigiert. Um Zellen

zu beobachten, wurden daher Deckgläser mit einer Dicke von $170\text{ }\mu\text{m} \pm 5\text{ }\mu\text{m}$, in Zellkulturschalen mit einem Loch, von unten eingeklebt. In diesen Zellkulturschalen mit Glasboden wurden die Zellen unter normalen Bedingungen kultiviert und mikroskopiert.

Für die Experimente, für die Zellkulturschalen mit Elastomer benötigt wurden, wurden Polydimethylsiloxane kreuzvernetzt. Dieser Elastomer wird auf ein Deckglas aufgebracht und hier im Weiteren als Elastomersubstrat bezeichnet.

Bei den Deckgläsern mit einer Beschichtung aus Elastomersubstrat wurde, wegen der Deckglasdickenkorrektur von dem verwendeten Objektiv, versucht eine Gesamtdicke von $170\text{ }\mu\text{m}$, bestehend aus Deckglas und Elastomersubstrat, zu erzeugen. Um zu gewährleisten, dass die Elastizität an der Oberfläche nicht durch das Deckglas beeinflusst wird (Merkel et al. 2007), wurde die Kombination aus $80\text{ }\mu\text{m}$ dickem Deckglas und, aus fertigungstechnischen Gründen, eine $80\text{ }\mu\text{m}$ dicke Elastomersubstratschicht gewählt.

Die Herstellung erfolgte nach einem Protokoll von Claudia Cesa (C.M. Cesa et al. 2007). Das Protokoll wurde an vielen Stellen für die Experimente angepasst. Um weiche Elastomere herzustellen, wurde PDMS bei einem Massenverhältnis, von Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer, von 50 zu 1 verwendet. Das Elastizitätsmodul hängt entscheidend von der Menge der Kreuzvernetzung ab. Das Massenverhältnis wurde deshalb immer auf $\pm 0,05\%$ eingestellt. Grundsubstanz und Kreuzvernetzer wurden ausgiebig gemischt und mit einer Vakuumpumpe in einem Exikator bei ca. $2 \cdot 10^{-3}\text{ mBar}$ entgast. Als Formkörper für das PDMS-Gemisch wurden Siliziumscheiben verwendet. Eine vorherige Silanisierung der Siliziumscheiben mit Trichlorosilane, erniedrigte die Haftung. Die Siliziumscheiben wurden dazu mit wenigen Tropfen von Trichlorosilane 15 min bei $2 \cdot 10^{-3}\text{ mBar}$ in einem Exikator inkubiert.

Als Mikrostrukturierung auf den Siliziumscheiben dient ein regelmäßiges Gitter, mit einer Kantenlänge von $3,5\text{ }\mu\text{m}$. Auf den Eckpunkten befindet sich jeweils ein Quader mit einer Kantenlänge von $2,5\text{ }\mu\text{m}$ und einer Höhe von ca. $0,5\text{ }\mu\text{m}$. Die Strukturen wurden mit standardisierten Fotolithografie-Techniken von Nico Hampe in die Siliziumscheiben eingebracht. Kurz vor der Verwendung wurden diese bei 130°C für 10 min auf einer Heizplatte ausgeheizt. Für eine fluoreszierende Mikrostrukturierung wurde eine wässrige Lösung aus fluoreszierenden Kugeln und dem entgasten PDMS-Gemisch in die Mikrostruktur der Siliziumscheiben eingegeben. Dazu wurden die fluoreszierenden Kugeln in der Lösung bei $5 \cdot 10^3 \times g$ für 3 min sedimentiert. Das Kugelsediment wurde mit einem Masse-zu-Volumen-Verhältnis (g/ml) von 0,2 % Kugeln zu PDMS-Gemisch vermengt.

Die Siliziumscheiben wurden mit fusselfreien Tüchern sauber gewischt. Dabei verbleibt in den $0,5\text{ }\mu\text{m}$ hohen Strukturen das PDMS-Gemisch mit den eingebetteten, fluoreszierenden Kugeln, in einer dünnen Schicht von unter $0,5\text{ }\mu\text{m}$.

Auf die so behandelte Oberfläche wird ein Tropfen des entgasten PDMS-Gemischs ohne Kugeln gegeben. Ein Deckglas mit der Dicke von 80 μm wurde mit Abstandshaltern von 80 μm zwischen Siliziumscheiben und Deckglas aufgelegt.

Das Deckglas wurde mit einem Objektträger stabilisiert. Der Stapel aus Siliziumscheiben, PDMS-Gemisch, Deckglas und Objektträger wurde mechanisch zusammengedrückt und für 16 Stunden bei 60°C ausgehärtet.

Im Anschluss wurde das Deckglas mit dem jetzt kreuzvernetztem PDMS von der Siliziumscheiben, mit Hilfe von Isopropanol, abgelöst. In der Mitte, des mit Elastomer beschichteten Deckglases, befindet sich am Ende der Prozedur ein ca. 1 x 1 cm großer Bereich (Größe der Siliziumscheiben), der die Mikrostrukturierung aus fluoreszierenden Kugeln, in einer etwa 0,5 μm dünnen obersten Schicht des Elastomers aufweist. Das präparierte Deckglas wurde von unten in Zellkulturschalen mit einem Loch eingeklebt.

Das Elastizitätsmodul und die Poissonzahl des Elastomers wurde von Niko Hampe nach einem Protokoll von Claudia Cesa bestimmt (Cesa et al. 2007) und wird im Folgenden kurz beschrieben.

Zylinder mit entsprechendem Mischungsverhältnis von Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer wurden schrittweise gedehnt. Die auftretende Kraft wurde, über die Änderung des Gewichtes mittels einer Waage, bestimmt und die Verformung optisch, mit Hilfe der Seitenansicht, bestimmt. Über die Breite des Zylinders ist auch eine Abschätzung des Volumens möglich. Das Elastizitätsmodul und die Poissonzahl wurden aus diesen Daten bestimmt.

Für die Präparation der Elastomersubstrate wurde ein Mischungsverhältnis (Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer) von 50:1 verwendet und 16 Stunden bei 60°C ausgehärtet. Bei der verwendeten Charge 21530, des Sylgard 184 PDMS, wurden folgende Parameter bestimmt:

$E = 14 \pm 1,4 \text{ kPa}$ und $\nu = 0.5$

2.3 Isolation kardialer Fibroblasten und Myozyten aus Herzen pränataler Ratten

Für die Organentnahme von embryonalen Herzen wurden schwangere Ratten am Schwangerschaftstag 18-19 verwendet. Die Muttertiere wurden zunächst mit CO_2 narkotisiert und anschließend durch Dekapitation mit einer Guillotine getötet. Der Bauchraum wurde geöffnet, der Uterus mit den Embryonen entnommen und auf Eis gelagert. Folgende Arbeiten wurden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt: Die Embryonen wurden aus dem Uterus präpariert und durch Dekapitation mit einer Schere getötet. Nach der Öffnung des Bauchraums wurden in Höhe des Rippenbogens, zu beiden Seiten Entlastungsschnitte gesetzt. Der Brustkorb wurde aufgeklappt und das Herz mit der Lunge aus dem Thorax entnommen. Unter einem Stereomikroskop wurden die Lunge und der Herzbeutel entfernt. Das Herz wurde in eiskaltes

HBSS überführt. Es wurden in der Regel 8-14 Embryonen aus einem Muttertier isoliert und deren Herzen nacheinander in 15 ml eiskaltes HBSS überführt.

Zum Entfernen von Blut und weiteren Verunreinigungen wurden die Herzen in 15 ml frisches, eiskaltes HBSS überführt und gewaschen. Die Herzen wurden auf eine mittlere Zellkulturschale gegeben, die restliche Flüssigkeit wurde vollständig abgesaugt und unter Zugabe von 500 µl Trypsin-EDTA Lösung (TE) mit zwei Skalpellen in ca. 1 mm³ große Gewebestücke zerkleinert. Diese Gewebeteile wurden mit 8 ml TE versetzt und 8 min bei 37°C verdaut. Die noch nicht verdauten Gewebeteile wurden vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Gewebeteile mit einer Enzymaktivität von 1000 Units DNase in 1 ml TE für 2 min inkubiert. Danach wurde 7 ml TE hinzugefügt und weitere 8 min bei 37°C verdaut. Feste Bestandteile wurden von der Zellsuspension getrennt. Die Zellsuspension wurde mit 8 ml Block-Lösung versetzt und auf Eis gelagert. Die noch nicht verdauten Teile wurden noch einmal mit DNase und 8 ml TE behandelt. Der Überstand dieser Verdauung wurde abgenommen und mit 8 ml Block-Lösung versetzt. In allen Verdauungsschritten wurden die Lösungen regelmäßig durchmischt.

Beide Block-Lösungen, mit der Zellsuspension aus dem zweiten und dritten Verdauungsschritt, wurden 10 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in MM+ aufgenommen, die Zellzahl über eine Neubauer-Zählkammer bestimmt und jeweils 6·10⁵ Zellen in einer mittleren Zellkulturschale ausgesät. In der Regel konnten aus 10 Herzen ca. 4·10⁶ Zellen isoliert werden. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Durch die beschriebene Methodik, wurde eine Primärkultur aus Myozyten und Fibroblasten gewonnen. Diese wurden bis zu zwei Wochen im Brutschrank kultiviert. Zur Differenzierung der kardialen Fibroblasten, wurden die Zellen mindestens fünf Tage inkubiert. Die getöteten Tiere wurden ordnungsgemäß entsorgt.

2.4 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen, die mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden auf 37°C vorgewärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank, bei einer Temperatur von 37°C, mit zusätzlicher 5% CO₂-Begasung und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Routinemäßig wurde das Medium alle zwei Tage erneuert. Zellen wurden in einer konstanten Wachstumsphase gehalten und nicht über einen Bedeckungsgrad von 80% hinaus kultiviert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Glas- oder Elastomersubstrat-Oberflächen, die zur Kultivierung der Zellen und in der Mikroskopie verwendet wurden, wurden zuvor mit Fibronectin beschichtet. Die Oberflächen, einer Fläche von 1,7 cm², wurden mit 430 µl einer Lösung, bestehend aus 20 µg/ml Fibronectin, bei 37°C für 30 min inkubiert. Unter der Annahme, dass der größte Teil des Fibronectins an die Oberfläche bindet, wird auf diese Weise eine Fibronectinbeschichtung von 5 µg/cm² erzielt.

2.5 Plasmide

Das GFP-Vinculin Fusionsprotein wurde durch die Arbeitsgruppe von B. Geiger (Weizmann Institute, Israel) zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein war im Vektor pGZ21 eingebaut. Die cDNS des Vinculin Proteins ist aus dem Huhn (*Gallus Gallus*). Das GFP befand sich N-terminal vor dem Leserahmen des Vinculins. Zur Expression wurde der Promotor des Zytomegalo Viruses benutzt.

Das Plasmid GFP- β -Aktin wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe von B. Geiger hergestellt. Die cDNS ist aus *Homo sapiens*. Als Promotor diente hier der β -Aktin-Promotor von *Homo sapiens*. Das GFP liegt C-terminal im Leserahmen hinter dem β -Aktin.

Das GFP-VASP-Konstrukt stammt aus der Arbeitsgruppe von J. Wehland (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Deutschland).

Die Fusionskonstrukte GFP-p130CAS, α -Actinin, DsRED-Vinculin, DsRED-VASP wurden von Simone Born hergestellt (Tabelle 1). Der spezifische cDNS-Abschnitt wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion mit zwei spezifischen Primern vermehrt.

Zur Klonierung wurde ein Vektor und das Produkt aus der Polymerase-Kettenreaktion mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Ligation beider DNS-Sequenzen wurde durch eine Ligase für 180 min bei Raumtemperatur vermittelt. Der *E-coli*-Stamm DH5alpha wurde mit dem entstandenen Vektor transformiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden nach Plasmidisolierung mittels Restriktionsverdau und Größenauftrennung durch Elektrophorese auf korrekte Herstellung des gewünschten Plasmides überprüft. Zusätzlich erfolgte eine kommerzielle Sequenzierung des vollständigen Fusionsproteins.

Farbstoff-Protein	Primer1	Primer2	spezifischer Genabschnitt	Restriktion zur Ligation	Vektor
eGFP-	CCGCTCGAGCAATGAACC	CGCGGATCCTCAGGCGGCTG	NCBI:	Xho I	pEGFP-C1
p130cas	ACCTGAACGTGCTGGCCA	CCAGCTGGCCTA	BC062556	BamH I	(Clontech)
DsRed-	CCGCTCGAGCAATGAGCG	CGCGGATCCTCAGGGAGAA	NCBI:	Xho I	pDsRed-Monomer-
VASP	AGACGGTCATCTGTT	CCCCGCTTCCT	BC038224	BamH I	C1 (Clontech)
DsRed-	CGAGCTCCAATGCCCGTC	CCGGAATTCATTACTGAT	NCBI:	Sac I	pDsRed-Monomer-
Vinculin	TTCCACACGCGCA	ACCATGGGGTCTTTCTGA	J04126	EcoR I	C1 (Clontech)
eGFP-	CCGCTCGAGCGCACCATC	CCCAAGCTTGAGGTCACTCT	NCBI:	Xho I	pEGFP-C1
α -Actinin	ATGGACCATTATGA	CGCCGTACA	M95178	Hind III	(Clontech)

Tabelle 1. Hergestellte Fusionsproteine

Positiv getestete Bakterienkolonien wurden bei -80°C in Glycerol in LB-Medium (1:2) gelagert. Die Vermehrung erfolgte in sterilem LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum. Die Präparation der Plasmide basierte auf der alkalischen Lyse (H.C.Birnboim 1979). Dazu wurde ein QIAfilter-Plasmid-Purification-Kit verwendet. Dieses wurde nach Protokoll des Herstellers

verwendet und anschließend die Konzentration der isolierten Plasmid-DNS photometrisch (NanoDrop) bei 260 nm bestimmt.

2.6 Transfektion

Die Transfektionsraten klassischer, auf Liposomen basierender chemischer Methoden, waren bei dem, für die Arbeit verwendeten Zelltyp, sehr gering. Deshalb wurde auf eine neuartige Nucleofektor-Technologie der Firma Amaxa zurückgegriffen. Dort wird die chemische Transfektion durch eine Elektroporation unterstützt. Durch die Entladung eines Kondensators werden Zellen, die sich zwischen zwei Elektroden befinden, einem elektrischen Feld ausgesetzt. Durch optimale Puffer-Bedingungen werden hier größere Transfektionsraten erzielt (Jacobsen et al., 2006). Darüber hinaus zeigen die Zellen im Experiment eine viel gleichmäßigere Expression des Fusion-Proteins.

Die isolierten kardialen Fibroblasten und Myozyten wurden mindestens fünf Tage auf Plastik kultiviert. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Zum Ablösen wurden $4 \cdot 10^5$ Zellen mit 2 ml TE für 2 min behandelt und anschließend mit derselben Menge MM+ vermischt. Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation bei $300 \times g$ für 2 min sedimentiert. Die Transfektion mittels Nucleofektor Technologie erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurden 100 μ l Nucleofektor Lösung mit 2 μ g Plasmid-DNS versetzt. Bei gleichzeitiger Verwendung von zwei Plasmiden wurden je 2 μ g Plasmid-DNS benutzt. Mit dem Gemisch wurde das Zellsediment aufgenommen und in die Amaxa-Küvette überführt. Im Nucleofektor wurde das Programm G-09 verwendet. Nach der Behandlung wurden die Zellen in 1 ml frischem Medium aufgenommen und erneut bei $300 \times g$ für 2 min sedimentiert. Das Sediment wurde in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Auf eine Oberfläche von 1 cm^2 wurden $2 \cdot 10^4 \pm 50\%$ Zellen ausgesät. Die Zellen wurden erst am nächsten Tag für das Experiment verwendet und maximal vier weitere Tage analysiert.

2.7 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Nutzung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (LSM: engl. Laser Scanning Microscope) wurde zum ersten mal 1988 beschrieben (Marvin 1988). Mit dieser Technik konnte die axiale Auflösung deutlich verbessert werden. Das Prinzip der verbesserten räumlichen Auflösung beruht auf einer Ausblendung des Lichts außerhalb der Fokusebene. Mit einem Laser wird durch das Objektiv ein beugungsbegrenzter Punkt beleuchtet. Von dem Objekt ausgehendes Licht (reflektiert oder ausgehend von fluoreszierenden Farbstoffen) wird durch das Objektiv zurück auf einen Punktdetektor gebracht. Durch das Einbringen einer Lochblende vor dem Detektor, an einer Stelle, an der das Licht einen Fokuspunkt hat (konfokale bzw. konjugierte Ebene des Lukenstrahlengangs), wird alles Licht außerhalb der Fokusebene blockiert. Der Beleuchtungspunkt wird in x- und y-Richtung über die Probe gefahren. Im Allgemeinen wird

dies über zwei Spiegel bewerkstelligt, welche über Galvanometerantriebe bewegt werden. Durch die Zusammensetzung der Abrasterung entsteht so ein Bild der Probe.

Durch selektive Beleuchtung von Teilbereichen in der Probe, war das Ausbleichen von Strukturen möglich. Für diesen Zweck wurde die Intensität der Laserbeleuchtung durch einen AOTF (Acousto Optic Tunable Filter) gesteuert (Wedekind et al. 1994). Mit diesem kann eine Schwächung der Beleuchtung unterhalb 1 μ s erreicht werden. Einzelne Bildpunkte, die durch den Scanner angefahren werden, können so mit sehr unterschiedlichen Laserleistungen bestrahlt werden. Auf diese Weise wird ein gezieltes Ausbleichen von fluoreszierenden Strukturen möglich.

Die Experimente wurden an einem inversen konfokalen Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Für den größten Teil der Arbeit wurde ein LSM 510 META genutzt. Für die Aufnahmen wurde ein 1.4 NA PlanApochromat DIC 63x Objektiv verwendet.

Zur Beleuchtung wurde die 488 nm Laserlinie eines Argon-Lasers und ein 543 nm Helium-Neon-Laser genutzt. Zudem wurde ein dielektrischer Strahlteiler mit der Reflektion bei 488 nm und 543 nm verwendet. Die Emission des GFP wurde mit einem Bandpassfilter zwischen 505 nm und 530 nm herausgefiltert. Für die Aufnahme des Signals der fluoreszierenden Kugeln wurde ein 650 nm Langpassfilter verwendet. Dadurch konnte das Signal des GFPs und der fluoreszierenden Kugeln ohne gegenseitige Beeinflussung simultan aufgenommen werden. Darüber hinaus wurden zusätzlich Reflektionsbilder aufgenommen. Hierzu wurde ein Strahlteiler, welcher 20% des Lichtes reflektiert und 80% transmittiert und die Laserlinie 543 nm verwendet. Gleichzeitig wurde eine Durchlichtaufnahme der Probe gemacht.

Die Experimente mit den DsRed-Konstrukten wurden an einem LSM 710 durchgeführt, und es wurde ein dielektrischer Strahlteiler mit der Reflektion bei 488 nm und 543 nm verwendet. Die Anregung erfolgte bei 488 nm. Emittiertes Licht wurde mit einem Detektor zwischen 505 nm und 540 nm aufgenommen. Danach wurde die 543 nm Laserlinie zum Anregen benutzt und die Emission oberhalb von 550 nm detektiert.

Bei beiden Mikroskopen wurde zur Temperaturkontrolle ein Inkubator genutzt, der über Warmluft beheizt wurde. Um eine noch bessere Stabilität der Temperatur im Bereich der Probe zu erreichen, wurde als Objekthalter ein aktiver Heizeinsatz verwendet. Um darüber hinaus die Bewegung der Probe, durch Ausdehnung oder Zusammenziehen der Bauteile aufgrund von Temperaturunterschieden, zu minimieren und Rotationen der Probe auszuschließen, wurde diese radial in einem speziell angefertigten Metallring gehalten. Dabei wurden lange Vorlaufzeiten von über vier Stunden eingehalten, um eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu gewährleisten. Die mechanischen Scanner und die Position der Lochblende wurden regelmäßig kalibriert.

Um Bildpositionen auswerten zu können, muss die Probe mit gleichbleibender Geschwindigkeit abgetastet werden, was nur bei einem auf Arbeitstemperatur gebrachten Scanner gewährleistet

ist. Für die Aufnahmen wurde eine Bildpunkbelichtungsdauer von ca. 6 μsec gewählt. Durch die beschriebenen Maßnahmen wurde die Stabilität der Bildgebung gewährleistet.

Das Bleichen eines Bildpunktes erfolgte bei beiden Mikroskopen bei maximaler Laserleistung des Argonlasers (ca. 30 mW Ausgangleistung), für eine Beleuchtungsdauer von 40 μsec pro Bildpunkt. Die Kantenlänge eines Bildpunktes betrug dabei 0,9 μm . In der Regel wurden Streifen mit einer Breite von 10 bis 15 Bildpunkten ausgebleicht.

2.8 Dehnung des Elastomersubstrats

Um eine Deformation in das Elastomersubstrat einzubringen, wurde die Spitze einer Kanüle benutzt. Die Position der Spitze wurde über die Durchlichtaufnahme bestimmt. Mit einem Mikromanipulator wurde so, unter optischer Kontrolle, die Kanülenspitze in die Nähe einer Zelle gebracht. Der Punkt, an dem die Kanüle die Oberfläche berührt, wurde durch die Reflektion der Kanüle bestimmt. Mit Hilfe der Reflektion an der Oberfläche wurden zudem die Adhäsionen von Zellen deutlich abgebildet. Es wurden nur einzelne Zellen außerhalb eines Zellverbandes untersucht (Abbildung 17 C). Als Kontrolle der Stabilität des Systems, ohne Einfluss des Dehnungsexperimentes, dienten Aufnahmen der Zellen vor dem Verzug. Erst dann wurde die Kanüle ca. 4 μm tief in das Elastomersubstrat eingestochen. Durch die Tiefe von 4 μm wurde ein Rutschen des Elastomersubstrats beim Bewegen der Kanüle nahezu vollständig vermieden. Um eine möglichst große Dehnung der Zelle zu erreichen, sollte die eingeleitete Deformation unterhalb der Zelle schnell abfallen (Abbildung 12). Der Abstand von Zelle zur Kanüle wurde deshalb möglichst klein gehalten und betrug ca. 40 μm . Es sei erwähnt, dass im direkten Bereich um die Kanüle ($>40 \mu\text{m}$) die Oberfläche nicht im Fokus liegt. Die Einleitung der Deformation erfolgte schrittweise durch die Bewegung der Kanüle. Die Kanüle wurde nur in den Pausen, zwischen den Aufnahmen, um ca. 1 μm bewegt. Dieses wurde ca. 12 bis 14 mal wiederholt, was einer Auslenkung der Kanüle um ca. 13 μm entspricht.

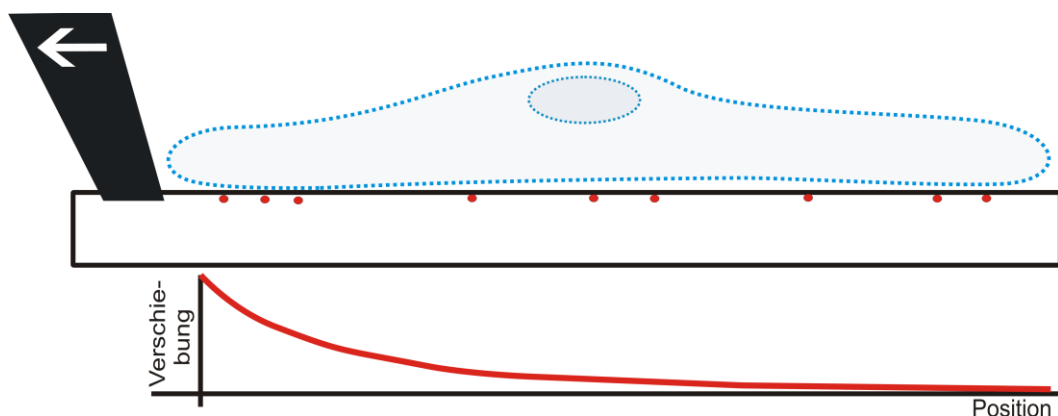


Abbildung 12. Dehnung einer Zelle (Pfeil) mit einer Kanüle (schwarz) auf Elastomersubstrat mit rot fluoreszierenden Kugeln an der Oberfläche. Das eingebrachte Deformationsfeld (rote Linie) nimmt schnell mit zunehmendem Abstand zur Kanüle ab.

Um die von der Kanüle verursachte Deformation wieder zu entfernen, wurde die Kanüle aus dem Substrat herausgehoben. In der Regel wurde die Kanüle vor dem Herausheben aus dem Elastomersubstrat auf ihre ursprüngliche Position vor dem Einstechen zurückgefahren.

2.9 Positionsbestimmung von Bildstrukturen

Zellen auf Elastomersubstraten, mit durch Fusionsproteinen angefärbten Strukturen, wurden über die Zeit aufgenommen. Die Positionen von fokalen Adhäsionen bzw. Stressfasern wurden im ersten Bild der Zeitreihe von Hand bestimmt. Bei einer Stressfaser wurden die Endpunkte und die dazwischenliegenden Stützpunkte analysiert. Der Verlauf zwischen den Stützpunkten wurde als Gerade angenommen. Als Position der Stützpunkte innerhalb der Stressfaser wurden die Kanten der zuvor eingebrachten Bleichstreifen gewählt. Die von Hand bestimmten Positionen, der abgefärbten Strukturen im ersten Bild dienten darüber hinaus als Startpunkt für die Mikrostruktur im Elastomersubstrat.

Für die Verschiebungsanalyse aller Mikrostrukturen im Substrat wurden die Startpositionen aller Kugeln im ersten Bild, durch Kreuzkorrelation mit einer beliebigen Kugel als Schablone bestimmt.

Zur Glättung des Signals wurden die Bilder mit einem 5 x 5 Bildpunkte großen zweidimensionalen Gaußprofil gefiltert. Es ist wichtig, dass es sich hier um eine positionserhaltene Filterung handelt. Die Positionen der Strukturen dürfen durch die Filterung nicht verschoben werden.

Im Weiteren wurden die Verschiebungen über die Zeit analysiert. Hierbei dienten die markierten Strukturen als Startpositionen. Jede dieser Positionen wurde als Zentrum für ein Fenster gewählt, welches die Strukturen enthielt. Mit Hilfe einer normierten Kreuzkorrelation (Formel 1) wurde in den folgenden Aufnahmen der Zeitserie, nach ähnlichen Strukturen gesucht. Hierzu wurde das Suchfenster doppelt so groß gewählt, wie das eigentliche, die Struktur beinhaltende Fenster und für jeden Bildpunkt innerhalb des Suchfensters die Kreuzkorrelation bestimmt.

$$r = \frac{\sum_x \sum_y (A_{xy} - \bar{A})(B_{xy} - \bar{B})}{\sqrt{(\sum_x \sum_y (A_{xy} - \bar{A})^2)(\sum_x \sum_y (B_{xy} - \bar{B})^2)}}$$

Formel 1. Normierte Kreuzkorrelation r. Jeder Grauwert eines Bildpunktes in x- und y-Richtung von Bild A wird mit Bild B kreuzkorreliert und mit den mittleren Grauwerten (\bar{A} und \bar{B}) normiert.

Der Bildpunkt mit dem maximalen Kreuzkorrelationskoeffizienten wurde als neues Zentrum des Fensters bestimmt, welches die gesuchte Struktur enthält und die Analyse auf diese Weise für die gesamte Zeitserie durchgeführt. Es wurde manuell eine Schwelle gesetzt, um somit eine

minimale Ähnlichkeit der gesuchten mit der vorgegebenen Struktur zu fordern. Nur Strukturen oberhalb dieser Schwelle wurden betrachtet. Auf diese Weise wurden die Positionen aller Strukturen für jeden Zeitschritt bestimmt.

Um Positionen genauer als die Bildpunktpositionen zu erhalten, wurde die Position des Scheitelpunktes einer Parabel bestimmt. Dazu wurden die benachbarten Kreuzkorrelationskoeffizienten des Maximums in x- und y-Richtung betrachtet. In diese Richtungen wurde an je drei Punkte eine Parabel angelegt. Die Position des Scheitelpunktes wurde als Position des Fensters angenommen. So wurden die genauen Positionen für alle Strukturen über die Zeit bestimmt.

Aufgrund thermischer Fluktuationen kommt es, unter anderem, zu einer Ausdehnung von Mikroskopbauteilen, was zu einer unerwünschten Bewegung der Probe führt. Diese Bewegung hat eine gleichmäßige Verschiebung aller Strukturen zur Folge, welche aus den Aufnahmen bestimmt werden kann und korrigiert werden muss. Hierzu wurden zunächst Bereiche in den Aufnahmen ausgewählt, welche weder durch Zellen, noch durch die Kanüle beeinflusst wurden. Das Ergebnis der Verschiebungsanalyse, der in diesem Bereich liegenden Kugeln, liefert einen Wert für die, durch thermische Einflüsse verursachte, unerwünschte und zu korrigierende, Bewegung der Probe.

2.10 Die durch die Zellen verursachte Deformation

Die von den Zellen eingebrachte Deformation in das Elastomersubstrat wurde bestimmt, indem nur Zellen, die ohne Kontakt zu anderen Zellen vorliegen, beobachtet wurden. So wurde die Überlagerung von Deformationsfeldern, nahe zueinander liegender Zellen, ausgeschlossen. Adhärante Zellen nehmen auf dem Elastomersubstrat ihre für sie typische Form an. Die dabei auftretenden Zellkräfte verformen das Substrat, über die fokalen Adhäsionen, in den Randbereichen der Zelle. Zu Beginn der Beobachtungen hatten die Zellen das Elastomersubstrat also bereits durch diesen Prozess verformt. Um die Verschiebung des Substrats durch die Zellen zu bestimmen, wurden die Aufnahmen der Zellen, nach Abschluss des Deformationsexperiments, also nachdem die Kanüle an ihre Ausgangsposition zurückgefahren und aus dem Elastomer entfernt wurde, mit Aufnahmen ohne Zelle verglichen. Um diese Referenzaufnahme zu erhalten wurden die Zellen mechanisch, mit der Kanüle, von der Oberfläche gewischt. Die Kanüle wurde hierzu ca. 1 μm tief eingestochen und über das Substrat bewegt, an der die Zelle saß. Nach Abschluss dieses Prozesses wurde die Kanüle herausgehoben und die Mikrostruktur erneut aufgenommen. Dabei wurde ca. 5 min zwischen Entfernung der Zelle und der Aufnahme gewartet, um sicher zu stellen einen äquilibrierten Zustand des Elastomers zu erhalten.

Für die Berechnung der mittleren Verschiebung der Mikrostruktur im Substrat, wurde der Zeitpunkt der maximal auftretenden Verschiebungen bestimmt. Für die höchsten 80% aller

Kugel-Verschiebungen wurden die Positionen berechnet. Für die weiteren Berechnungen wurden nur die Verschiebungen dieser Kugeln für die Bestimmung des Mittelwertes herangezogen.

2.11 Spezifische Färbung mittels Immunfluoreszenz sowie mit Phalloidin markierten Farbstoffen

Zellen bzw. Oberflächen wurden für die Aufnahmen mit dem LSM oder für die dSTORM gefärbt. Die grundlegende Prozedur ist hierbei gleich. Die Konzentrationen der eingesetzten, spezifischen Farbstoffe, unterscheidet sich für die beiden Techniken allerdings deutlich.

Für die Färbung von Zellen wurden die Zellen auf den Glasbodenschalen oder auf den Elastomersubstraten kultiviert. Hierzu wurden $2 \cdot 10^4$ Zellen pro 1 cm^2 ausgesät und zwei Tage kultiviert. Zur spezifischen Färbung von Proteinen innerhalb der Zellen, wurden die spezifischen Bindungen von Antikörpern und Phalloidintoxinen genutzt.

Die Zellen wurden mit Fixierlösung für 30 min im Brutschrank behandelt. Sie wurden zweimal für je 5 min mit Glycin-CB (30 mM) gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen mit 0,3% Triton x-100 in CB für 30 min inkubiert. Danach wurden sie mit 5% fettfreiem Milchpulver in CB für 30 min behandelt. Der erste Antikörper, spezifisch gegen das gewünschte Protein in den Zellen, wurde mit 5% Milchpulver in CB 1:100 verdünnt. Eine Zellkulturoberfläche wurde mit 50 μl dieser Verdünnung für 45 min inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml Glycin in CB (30 mM) für je 5 min entfernt. Der zweite Antikörper, mit kovalent gekoppelten fluoreszierenden Molekülen, wurde mit 5% Milchpulver in CB 1:200 verdünnt. Die Färbung mit Phalloidintoxin erfolgte ebenfalls in diesem Schritt und wurde in 5% Milchpulver 10^{-4} -fach verdünnt. 100 μl dieser Lösung wurde auf einer Glasbodenschale für 2 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit 1 ml PBS für 5 min gewaschen und in PBS mikroskopiert.

Für Untersuchungen zur Charakterisierung der dSTORM wurden Glasbodenschalen, mit dem zweiten, fluoreszierenden Farbstoff tragenden Antikörper, beschichtet. Dazu wurden unterschiedliche Verdünnungen in entgastem PBS verwendet. Es wurden Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-7} verwendet. Um den Großteil aller gelösten Gase zu entfernen, wurde das verwendete PBS bei $2 \cdot 10^{-3}$ mBar für 30 min entgast. Der Antikörper wurde in PBS verdünnt und 250 μl für 30 min auf den Glasbodenschalen inkubiert. Anschließend wurden die Oberfläche dreimal mit 2 ml PBS gewaschen. Mikroskopiert wurden sie in entgastem PBS pH 7,4 mit 100 mM MEA.

Zur Positionsbestimmung für die Bewegungskorrekturen in der dSTORM wurden fluoreszierende Kugeln in die Probe eingebracht. Hierzu wurden Glasbodenschalen für 30 min mit 100 μl PBS und 0,003% (Gewicht zu Volumenverhältnis) fluoreszierenden Kugeln inkubiert.

Die Glassbodenschalen wurden anschließend mit PBS gewaschen, um nicht physisorbierte Kugeln zu entfernen.

2.12 dSTORM

Für die dSTORM wurde ein Mikroskop von Olympus verwendet. Zur Beleuchtung dienten Laser mit den Wellenlängen 488 nm und 561 nm. Die Laserstrahlen wurden durch einen AOTF (Acousto Optic Tunable Filter) geleitet. Der Strahl wurde aufgeweitet und auf die hintere Fokalebene (konjugierte Ebene des Pupillenstrahlengangs) des Objektivs fokussiert. Durch einen dielektrischen Strahlteiler wurde das Anregungslicht in das Objektiv gelenkt. Die Emission wurde vom Objektiv aufgefangen und passierte den Strahlteiler. Ein Dualbandpassfilter selektierte nochmals die Emissionen. Die Aufnahme erfolgte mit einer EMCCD (Electron-Multiplying-Charge-Coupled-Device) Kamera.

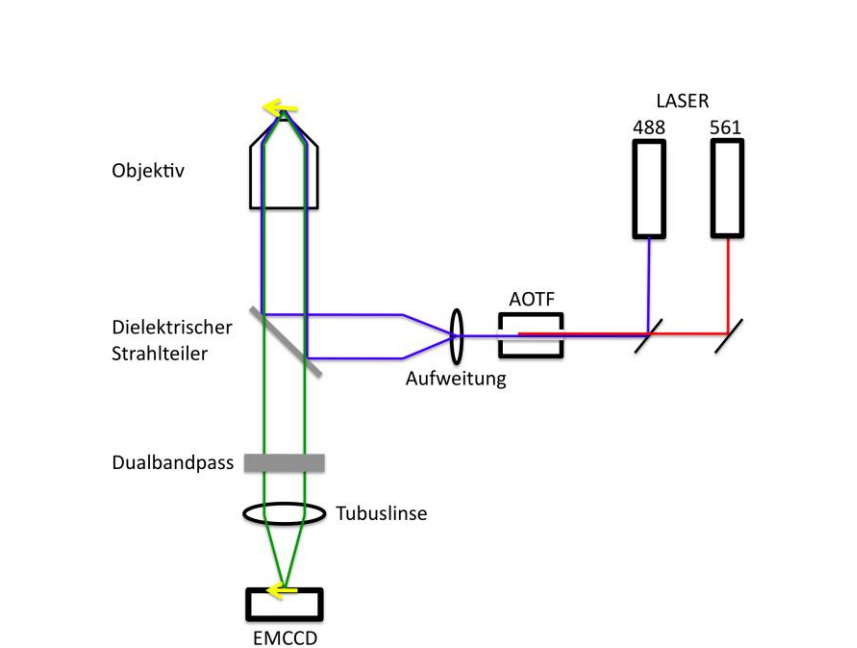


Abbildung 13. Schematischer Aufbau für dSTORM. Eine Probe (Pfeil) wird mit Lasern beleuchtet und die Emission mit einer EMCCD aufgenommen. Gezeigt ist der Lukenstrahlengang.

2.12.1 Korrektur der durch Thermik verursachten Bewegung der Probe

Durch thermische Ausdehnungen der Bauteile bewegt sich die Probe im Vergleich zur Kamera. Die Probe wird in x- und y-Richtung aufgenommen. Der Fokus des Mikroskops bestimmt dabei die betrachtete z-Position. Die unerwünschte Bewegung der Probe in x- und y-Richtung, muss in der Aufnahmedauer von ca. 5 min (1000 Aufnahmen) korrigiert werden. Dazu wurden fluoreszierende Kugeln in die Fokusebene eingebracht. Die Absorptions- wie Emissionsspektren

der Kugeln und der Färbung der Probe sollten dabei unterschiedlich sein, um eine gegenseitige Beeinflussung zu minimieren. Beide verwendeten Anregungswellenlängen müssen von dem dielektrischen Strahlteiler durchgelassen werden. Die Emission der Farbstoffe wurde durch einen Bandpassfilter mit zwei Bereichen gefiltert.

2.12.2 Genauigkeit der Positionsbestimmung

Durch ein Objektiv wird ein vergrößertes Abbild der Probe erzeugt. Bei unendlicher Optik entsteht erst durch eine Tubuslinse ein reales vergrößertes Bild. Im rückwärtigen Fokus des Objektivs wird das Bild von einem Bildsensor erfasst. Der Bildsensor ist aus einzelnen Punkten aufgebaut, die in einem quadratischen Raster angeordnet sind. Jeder Bildpunkt ist ein eigener Sensor und detektiert das Licht, welches aus einem Bereich aufgefangen wird.

Die Funktionsweise des Sensors ist entscheidend für die Messung des real vergrößerten Bildes, da das dargestellte Bild immer eine Umwandlung aus dem realen Bild auf dem Sensor ist. Die Detektion des Signals erfolgte im Experiment über eine Back-Side-Illuminated-Electron-Multiplying-Charge-Coupled-Device (EMCCD) Kamera. Das Grundelement jeden Bildpunktes ist eine einzelne „Charge Coupled Device“ Zelle (CCD übersetzt: Ladungsgekoppeltes-Bauteil). Einfallende Photonen entfernen aus einer Zelle Elektronen (durch einen photoelektrischen Effekt). Die Anzahl der ausgelösten Elektronen ist proportional zur Anzahl der Photonen. Die Elektronen in jedem Bildpunkt einer Zeile können einzeln zum Rand transportiert werden. Dort werden sie analog gemessen und digitalisiert. Bei einer EMCCD (übersetzt: Elektronen-multiplizierendes-Ladungsgekoppeltes-Bauteil) Kamera, werden die Elektronen jeder Zeile erst vervielfältigt, bevor sie ausgelesen werden. Durch diese nachträgliche Verstärkung können sehr kleine Lichtmengen gemessen werden.

Normale CCD-Kameras werden von der Oberseite her beleuchtet. Durch den Aufbau einer CCD-Zelle befinden sich dort Bereiche, die nicht lichtempfindlich sind. Diese absorbieren einfallendes Licht, welches dadurch nicht detektiert werden kann. Die CCD-Zellen können auch rückseitig beleuchtet werden (Back-Side-Illuminated; übersetzt: rückseitig beleuchtet). Die ganze Zelle detektiert dabei das einfallende Licht, was die Quantenausbeute und die damit verbundene Empfindlichkeit erhöht.

Bei der Messung eines Bildes mit einer EMCCD, misst jeder Bildpunkt als Sensor die Intensität in einem Bereich des Bildes. Bei einer mikroskopischen Betrachtung werden in der Regel Kantenlängen von ca. $0,1\ \mu\text{m}$ von einem Bildpunkt abgebildet. Dabei schwankt die gemessene Intensität, bei gleichem Signal, aus verschiedenen Gründen. Die Standardabweichung des Signals wird als Rauschen bezeichnet. Die Ursachen des Rauschens sind unterschiedlichen Ursprungs.

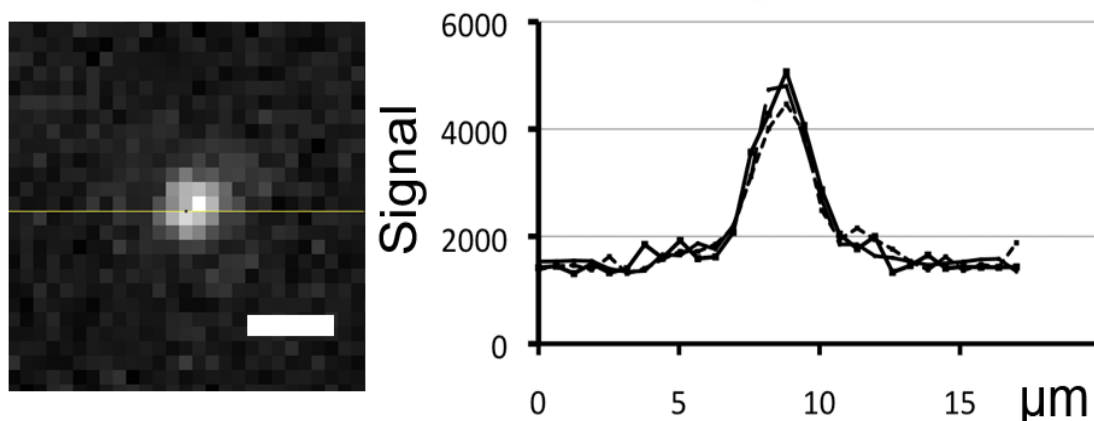


Abbildung 14. Beugungsbegrenzter Punkt in einer EMCCD von einer rot fluoreszierenden Kugel. Maßstab 2 µm. (rechts) Profil des Punktes von drei zeitlich aufeinanderfolgenden Aufnahmen. Bildpunktgröße 0,066 µm.

Eine Komponente ist dabei das Photonenrauschen. Die Menge, von einer Lichtquelle emittierten Photonen, sind statistischen Schwankungen unterworfen. Bei einer Poisson-Verteilung des Signals (N), wächst die Standardabweichung des Signals nur mit \sqrt{N} . Das Signal zu Rauschverhältnis ist N/\sqrt{N} . Die Genauigkeit des Signals steigt daher mit dem Signal um \sqrt{N} .

Wenn nur das Photonenrauschen die Messgenauigkeit beeinflussen würde, wäre der mittlere

Fehler der Positionsbestimmung $\langle \Delta x \rangle = \frac{d/2\sqrt{2\ln 2}}{\sqrt{N}}$ (R. E. Thompson et al. 2002).

Durch thermische Schwingungen im Gitter des Detektors, werden Elektronen unabhängig von eingestrahnten Photonen generiert. Dieses so genannte Dunkelrauschen ist von der Temperatur abhängig. Je höher die Temperatur, desto mehr Elektronen werden freigesetzt. Um diesen Effekt zu minimieren, werden die Detektoren auf -80°C gekühlt.

Das Signal, welches von der Probe durch fluoreszierende Objekte emittiert wird, kommt im Idealfall nur von dem Farbstoff, der spezifisch an Zellstrukturen gebunden ist. Nicht spezifische Bindungen führen hier zu einer Erhöhung des Rauschens. Signale außerhalb der Fokusebene, spezifisch oder unspezifisch, erhöhen dieses Hintergrundrauschen noch einmal.

Bei der Umwandlung der gesammelten Elektronen in digitale Bilddaten, entsteht das sogenannte Ausleserauschen. Hier gibt es viele Quellen, die zu einer zusätzlichen Schwankung des Signals führen. Der wesentliche Anteil der Schwankungen bei einer EMCCD entsteht hier durch die nachträgliche Verstärkung des Signals.

Alle Komponenten, die zum Rauschen des Signals führen, sind unabhängig und können anhand von Kontrollmessungen abgeschätzt werden.

Positionsbestimmung

Um die Positionen der Kugeln und der Antikörper genau zu bestimmen, wurden zuerst die groben Positionen der enthaltenen zweidimensionalen PSF ermittelt. Dazu wurde wie in

Abschnitt 2.9 beschrieben, ein Bild mit der im Bild auftretenden, zweidimensionalen PSF kreuzkorreliert. Die enthaltende zweidimensionale PSF wurde aus den ersten zehn Bildern jeder Aufnahme ermittelt. Das Bild wurde zunächst mit einer synthetischen zweidimensionalen PSF kreuzkorreliert. Diese Methode lieferte in erster Näherung die Positionen, der im Bild enthaltenden, beugungsbegrenzten Punkte. Im nächsten Schritt wurden diese Positionen als Zentren von Fenstern angenommen, welche so groß gewählt wurden, dass genau eine zweidimensionale PSF, je Fenster, eingeschlossen wurde. Alle Fenster wurden aufsummiert und gemittelt. Auf diese Weise erhielt man ein Abbild der tatsächlichen zweidimensionalen PSF des Systems.

Mit diesem realen Abbild der zweidimensionalen PSF wurden alle Bilder erneut kreuzkorreliert. Durch das Setzen einer Schwelle und das Extrahieren der lokalen Maximalwerte, konnten so die grobe Position der beugungsbegrenzten Punkte eines Bildes bestimmt werden. An die, auf diese Weise erhaltenen Koordinaten wurde im Originalbild jeweils eine eindimensionale Gaußkurve, so lange in x-Richtung als auch in y-Richtung angepasst, bis das Quadrat der Abweichung der Signalwerte in den Bildpunktpositionen zu der Gaußkurve ein Minimum erreichte.

$$Signal = H + ST * \varepsilon^{\left(-0.5 \left(\frac{x-xpos}{xstd}\right)^2\right)}$$

Formel 2. Normalverteilung an eine PSF. Signal = Signal an Stelle x; H = Hintergrundsignal; ST = Signalstärke; xpos = Position vom Maximum; xstd = Standardabweichung von x.

Aus den angelegten Gaußkurven konnten folgende Parameter bestimmt werden. Die Signalstärke (Amplitude) des Zentrums und das Hintergrundsignal. Die Breite der Gaußkurve in x- und y-Richtung, sowie die x- und y-Positionen der Scheitelpunkte. Nur Gaußkurven mit einer Standardabweichung zwischen 1 und 4 Bildpunkten wurden zugelassen.

Die Bewegung der Probe in x- und y-Richtung wurde mit Hilfe der fluoreszierenden Kugeln ermittelt. Die Fluoreszenzfarbe der Kugeln unterschied sich von der Färbung der Probe, so dass diese getrennt voneinander aufgenommen werden konnten (Abbildung 15). Die Bestrahlungsintensität konnte durch einen AOTF schnell geändert werden. Dieses ist nötig, da während der Aufnahme die Verstärkung der Kamera nicht schnell genug geändert werden kann. Über die Veränderung der Bestrahlungsintensität konnte für jede Farbe ein optimales Bild erzeugt werden. Die fluoreszierenden Kugeln wurden nur in jedem zehnten Zeitschritt angeregt. Die Position der Kugeln wurde bestimmt und so die Bewegung der Probe ermittelt. Die Bewegung der Kugeln zwischen den zehn Aufnahmen wurde als linear angenommen. Die ermittelten Positionen der fluoreszierenden Farbstoffe (z.B. Antikörper) wurden mit dieser Bewegung korrigiert.

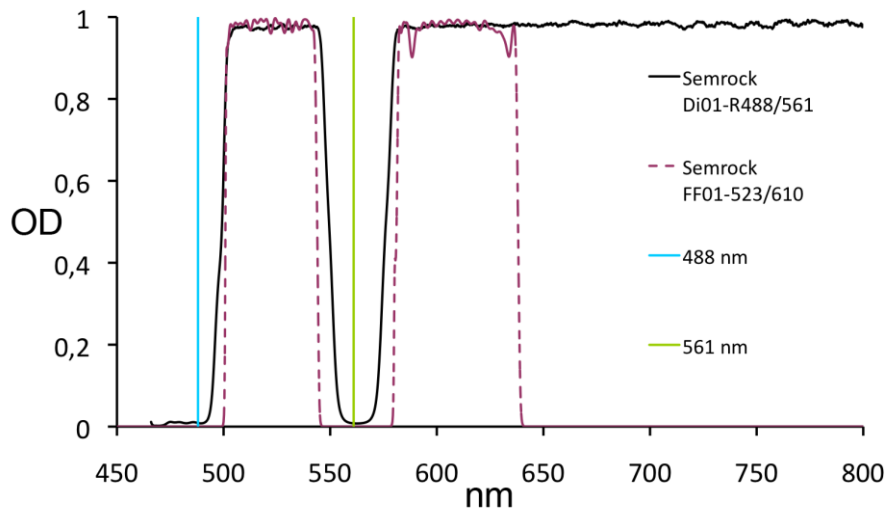


Abbildung 15. Optische Dichte des Strahlteilers und des Filters in der dSTORM.

Messung

Für die Messung wurden Glasbodenschalen mit Antikörpern und fluoreszierenden Kugeln mikroskopiert (Abschnitt 2.11). Jeder gemessene Ausschnitt der Proben wurde vorher für 5 min mit 100 % Laserintensität des 561 Lasers (Ausgangsleistung 50 mW) bestrahlt, um die fluoreszierenden Farbstoffe in den Dunkelzustand zu überführen (Abschnitt 1.4.4). Die Messung wurde bei 30% Laserintensität des 561 nm bzw. 0,5% Laserintensität des 488 nm (Ausgangsleistung 100 mW) bei einer Aufnahmezeit von 100 ms durchgeführt. In der Regel wurden 1000 Aufnahmen aufgenommen, was einer Dauer von ca. 5 min entspricht.

Simulation der Positionsbestimmung

Die Genauigkeit der Positionsbestimmung wurde mittels einer Monte-Carlo-Simulation getestet. Hierzu wurden folgende Parameter verwendet: Die Signalstärke eines beugungsbegrenzten Punktes und seine Breite; die Höhe des Hintergrundsignales und das Rauschen von Signalen, verursacht durch die verschiedenen Rauschquellen; die ersten beiden Parameter können aus Originalaufnahmen eines beugungsbegrenzten Punktes abgeschätzt werden.

Um das Hintergrundsignal der Kamera abzuschätzen, wurde bei vollständiger Dunkelheit gemessen. Die Signale jedes Bildpunktes wurden 100-mal aufgenommen und das mittlere Signal bestimmt. Zur Kontrolle wurden unterschiedliche Belichtungszeiten getestet.

Das Dunkel-, Photonen- und Kamerarauschen wurde mittels einer fluoreszierenden Fläche bestimmt. Dazu wurde ein Objektträger aus Plastik mit einer durchgängigen Fluoreszenz, mit einer maximalen Anregung bei 560 nm und einer maximalen Abstrahlung bei 630 nm mit dem 561 nm Laser (Ausgangsleistung 20 mW) beleuchtet. Der AOTF wurde dabei auf 0,5% gestellt. Die Signale jedes Bildpunktes wurden 100-mal aufgenommen und das mittlere Signal, sowie die Standardabweichung der Signale bestimmt. Verschiedene Aufnahmezeiten wurden gemessen, um unterschiedliche Signalstärken zu erhalten.

Es wurde eine synthetische Abbildung einer zweidimensionalen PSF durch eine Gaußkurve in x- und y-Richtung erzeugt. Die Breite der Kurve (Standardabweichung = 97 nm), die Amplitude (Grauwert 6000) und das Hintergrundsignal (Grauwert 300) wurden aus Originalaufnahmen abgeschätzt. Die Helligkeitsverteilung wurde auf Bildpunkte einer festen Größe verteilt (66 nm). Dabei ist zu beachten, dass hier die Position des Scheitelpunktes vorgegeben wird.

Jeder Pixel wurde 1000-mal, in Abhängigkeit seiner Signalstärke, statistisch mit dem abgeschätzten Rauschen versehen. In jeder Abbildung wurde die Position des Scheitelpunktes mittels Anlegen einer eindimensionalen Gaußkurve ermittelt. Im Anschluss wurden die Abweichungen zwischen der vorgebenden Position und der gemessenen Position bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von kreuzvernetzten Elastomersubstraten

Um Zellen einer Dehnung auszusetzen, wurden diese auf Elastomersubstrate ausgesät. Das Ziel war es, die elastischen Eigenschaften von Zellen zu analysieren. Hierbei war es unerlässlich, zunächst die elastischen Eigenschaften der verwendeten Elastomersubstrate zu bestimmen. Das Elastizitätsmodul und die Poissonzahl wurden im Volumen eines Zylinders an Luft bestimmt (Abschnitt 2.2.1). Nach einer Verformung wurde so lange gewartet, bis sich eine konstante Deformation eingestellt hatte. Die Zeit, die für das Erreichen des Ruhezustandes benötigt wurde, wurde nicht bestimmt. Anders als bei der Kalibrierung werden im Experiment nur Deformationen an der Oberfläche des Elastomersubstrates eingeleitet. Die Oberfläche des Elastomersubstrates ist dabei vollständig von Zellkulturmedium bei 37°C umgeben. Es sei erwähnt, dass die Kultivierung von Zellen auf den Elastomersubstraten bis zu fünf Tage erfolgte, was zu einer Änderung der mechanischen Eigenschaften führen könnte.

Um zu überprüfen ob und mit welcher Dauer eine eingebrachte Deformation an der Oberfläche tatsächlich im Experiment vollständig verschwindet, wurden Kontrollexperimente durchgeführt.

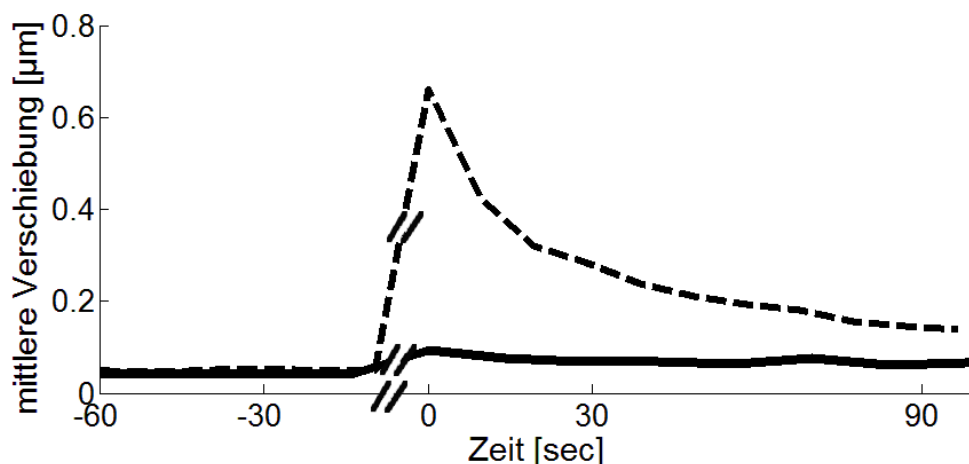


Abbildung 16. Mittlere Verschiebung im Elastomersubstrat nach der Einleitung eines Deformationsfelds. Der Zeitpunkt Null entspricht dem ersten Zeitpunkt nach der Dehnung durch die Kanüle. Alle Zeitpunkte davor entsprechen den Verschiebungen vor der Dehnung (zufällige Fluktuationen des Systems). Die Zeitspanne die für die Dehnung benötigt wird ist nicht gezeigt. Die Kanüle wurde entweder bei der maximalen Auslenkung (gestrichelt) oder erst nach Anfahren der ursprünglichen Position (durchgezogen) entfernt.

Hierzu wurde in mikrostrukturierte Elastomersubstrate eine, für die Zelleexperimente typische Deformation eingeleitet. Die Kanüle liegt dabei, wie im Experiment mit Zelle, am Rand des betrachteten Ausschnitts. Wie auch bei den Experimenten mit Zellen, wurde eine Dehnung in das Elastomersubstrat durch Einstechen und Verziehen eingeleitet.

Nach der Deformation wurde die Kanüle aus der Oberfläche herausgehoben und die Verschiebung der Mikrostruktur relativ zur Position vor der Berührung mit der Kanüle verglichen (Abbildung 16).

Das Herausheben der Kanüle erfolgte von zwei unterschiedlichen Positionen aus. Zum einen wurde die Kanüle an der Position der maximalen Auslenkung heraus gehoben, zum anderen wurde sie nach der Verschiebung wieder zum Ausgangspunkt zurück gefahren, und erst dann heraus gehoben.

Wurde die Kanüle bei der maximalen Auslenkung entfernt, konnte direkt nach dem Entfernen eine deutliche Verformung der Oberfläche beobachtet werden. Die mittlere Verschiebung nimmt daraufhin mit der Zeit ab, erreicht aber in dem betrachteten Zeitraum nicht das Niveau wie vor der Dehnung (Abbildung 16 gestrichelt).

Wurde die Kanüle nach der Auslenkung, vor dem Entfernen auf die Position vor dem Einstechen zurückgefahren, war die mittlere Verschiebung im Substrat vor und nach der Dehnung identisch (Abbildung 16 durchgezogen).

Zudem wurde untersucht, ob sich, durch eine mechanische Entfernung der Zelle, ein reproduzierbares Bild des Elastomersubstrates ohne den Einfluss der Zelle erzeugen lässt. Darüber Hinaus wurde der Einfluss der mechanischen Entfernung analysiert. Dazu wurden transfizierte Myofibroblasten auf mikrostrukturierten Elastomersubstraten ausgesät (Abbildung 17 A). Die Zelle deformiert das Elastomersubstrat, so dass dieses zum Zeitpunkt der Beobachtung bereits durch die Zelle verformt wurde (Abbildung 17 B). Mit der Spitze einer Kanüle (Abbildung 17 C und D) wurde die Zelle von der Oberfläche entfernt, indem sie mechanisch weggewischt wurde. Um einen Zusammenhang mit der Eindringtiefe der Kanüle auszuschließen, wurde mit unterschiedlichen Eindringtiefen der Kanüle gearbeitet. Hierzu wurde die Spitze zunächst nur leicht in das Substrat eingetaucht (Abbildung 17 E1). Nach dem Entfernen der Zelle wurde die Position der Mikrostruktur ermittelt und mit der Position vor der Entfernung verglichen (Abbildung 17 E2). Dieser Vorgang wurde mit unterschiedlichen Eindringtiefen der Kanüle wiederholt (Abbildung 17 F).

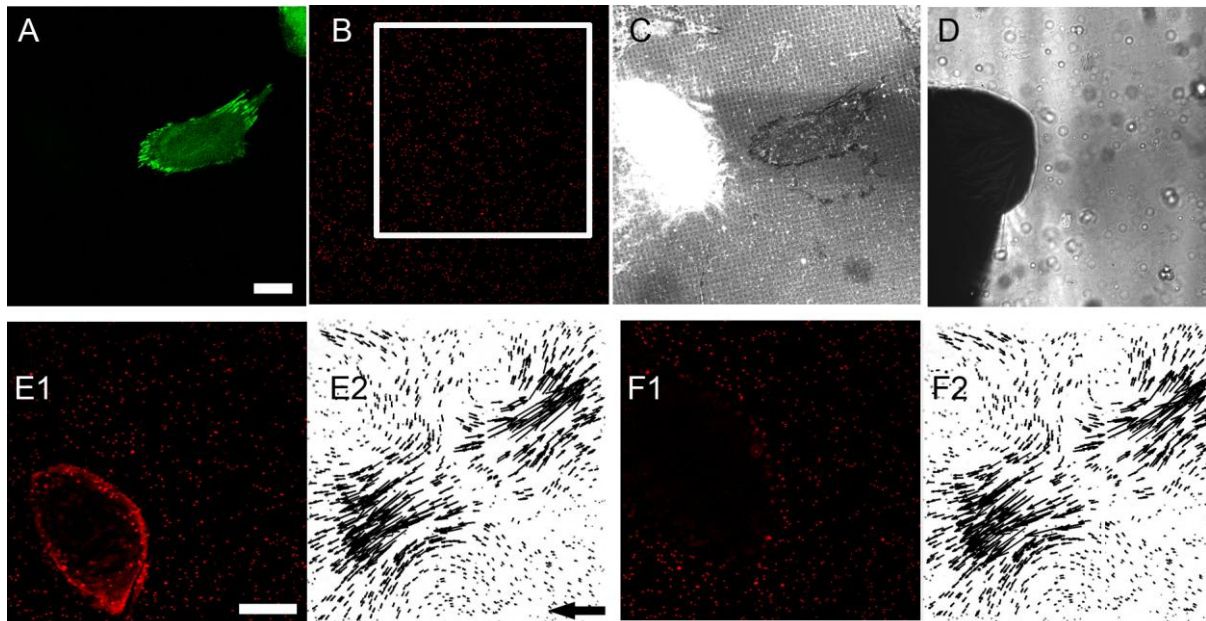


Abbildung 17. Entfernen der Zelle durch mechanisches Wegwischen vom Elastomersubstrat. (A-D) Myofibroblast auf Elastomersubstrat. (A) Transfiziert mit GFP-VASP auf (B) Mikrostruktur aus fluoreszierenden Kugeln. (C) Reflexion und (D) Durchlicht mit der Kanüle im Bild links. Die Zelle wurde mit der Kanüle entfernt, indem die Kanüle 1 μm tief eingestochen wurde (E1) und dann die Zelle abgenommen wurde. (E2) Das resultierende Deformationsfeld nach dem Entfernen der Zelle wurde gemessen. Mittlere Verschiebung 0,65 μm (F1) Wiederholung mit 5 μm tief eingestochener Kanüle und (F2) Deformationsfeld. Mittlere Verschiebung 0,63 μm , Maßstab 20 μm , Verschiebung schwarzer Pfeil 2 μm .

3.2 Verbindung zwischen fokalen Adhäsionen und der EZM

Zellen sind mit ihren fokalen Adhäsionen mit der EZM verbunden. In einem Experiment wurde untersucht, wie fest diese Verbindung ist. Um die fokalen Adhäsionen zu verfolgen, wurden Myofibroblasten mit GFP-Fusionsproteinen transfiziert. Um zudem die Deformation unterhalb der Zelle zu bestimmen, wurden Elastomersubstrate mit fluoreszierenden Kugeln verwendet (Abbildung 18 A).

Für das Experiment wurden die Positionen einzelner fokaler Adhäsionen in der Peripherie der Zelle beobachtet. Gleichzeitig wurde die Positionen der Elastomersubstrate ermittelt, welche unterhalb der entsprechenden fokalen Adhäsionen lagen. Die Verschiebung der FA und der unterliegenden Substratbereiche wurden ohne eingeleitete Deformation bestimmt. Dabei auftretende Schwankungen wurden über einen Zeitraum aufgenommen, der auch für das Einbringen des Deformationsfeldes benötigt wird (ca. 2 min). Die FA und die entsprechenden Substratbereiche bewegen sich in diesem Zeitraum nur geringfügig.

Eine Deformation wurde stufenweise mit einer Kanüle eingeleitet. Die eingebrachte Deformation fällt mit zunehmender Entfernung zur Kanüle schnell ab. Dieses führt zu einer Dehnung des Elastomers im Bereich des abfallenden Deformationsfeldes.

Bei maximaler Dehnung wurden die Verschiebungen von FA und Substrat erneut bestimmt (Abbildung 18 C schwarze Kreuze). Die maximale Dehnung unterhalb der Zelle betrug 3-4%, in

Bezug zum Durchmesser der Zelle von ungefähr 100 μm . In der Nähe der Kanüle wurde eine Verschiebung im Substrat von bis zu 4 μm gemessen. Über das Bildfeld nimmt die Verschiebung auf unter 1 μm ab. Die Verschiebungen der fokalen Adhäsionen waren dabei immer vergleichbar mit den Verschiebungen des Untergrundes. Dabei wurden verschiedene fokale Adhäsionsmarker wie GFP-p130CAS (4 Zellen mit 33 FAen), GFP-Vinculin (7 Zellen mit 101 FAen) und α -Actinin (3 Zellen mit 2 FAen) getestet. Alle getesteten Proteine zeigten die gleichen Ergebnisse wie GFP-VASP (Abbildung 18).

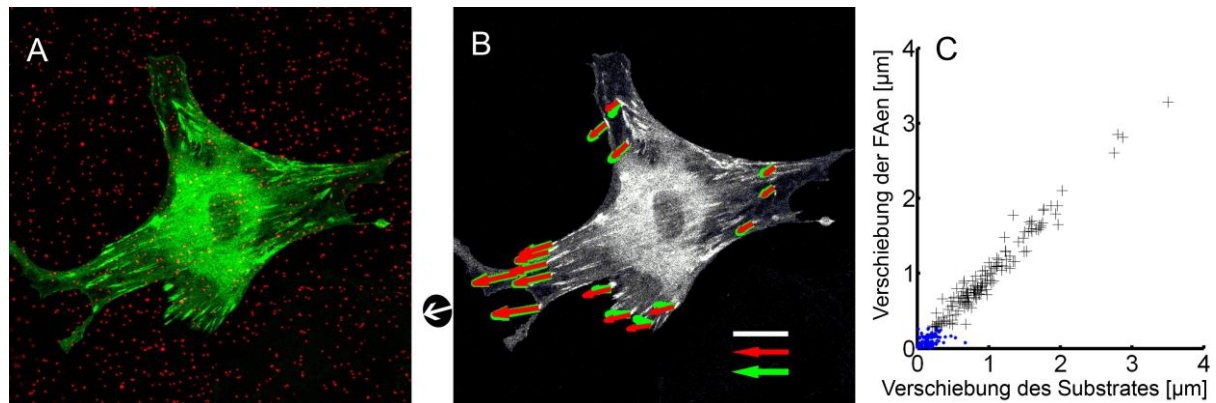


Abbildung 18. Verschiebung der fokalen Adhäsionen und der Substrate in Zellen. (A) Myofibroblast transfiziert mit GFP-VASP (grün) auf Elastomersubstrat mit fluoreszierenden Kugeln (rot). (B) Ein Deformationsfeld wurde an der linken Seite der Zelle mechanisch durch eine Kanüle (schematisch schwarzer Punkt) eingeleitet. Die Auslenkungsrichtung ist mit einem weißen Pfeil skizziert. Die Verschiebungen sind als Pfeile dargestellt. Maßstab 20 μm ; Verschiebung 2 μm . (C). Verschiebung der fokalen Adhäsionen und der Substrate. Verschiebung vor einer Dehnung (blaue Punkte) und bei maximaler Dehnung (schwarze Kreuze) ($n=10$ Zellen mit 122 fokalen Adhäsionen)

3.3 Krafteinleitung von Zellen nach einer Dehnung

Zellen verformen elastische Substrate, wenn sie auf diesen kultiviert werden. Hier wurde analysiert, welchen Einfluss eine Dehnung der Zelle auf die von der Zelle verursachte Deformation des Substrates hatte. Für diese Untersuchung wurde, wie in Abschnitt 2.10 beschrieben, eine Referenz ohne Zelle erzeugt, indem diese mechanisch entfernt wurde. Wie auch in vorherigen Experimenten, wurden Zellen mechanisch durch eine Substratdeformation gedehnt und die durch die Zelle eingeleitete Verformung des Elastomersubstrates vor und nach der mechanischen Dehnung gemessen.

Hierzu wurde der Unterschied der Verschiebung der Mikrostruktur im Substrat, vor und nach einer mechanischen Dehnung, im Vergleich zu den Positionen ohne Zelle, ermittelt. Die Verschiebung, verursacht durch die Zelle, wird durch die Dehnung reduziert (Abbildung 19). Vor und nach einer Dehnung ist die jeweils eingeleitete mittlere Verschiebung konstant, das Elastomersubstrat also äquilibriert.

Um darüber hinaus einen Einfluss der Transfektion oder des Bleichvorgangs auf die mittlere Verschiebungen, der durch die Zelle eingeleitete Deformation, auszuschließen, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt:

Der Einfluss des Bleichens wurde analysiert, indem mit GFP-Aktin transfizierte Zellen mit und ohne Bleichstreifen gedehnt wurden. Auch ohne den Vorgang des Bleichens ist ein Abfall der mittleren Verschiebung nach der Dehnung festzustellen. Ebenso wurde dieser Abfall bei GFP-VASP transfizierten Zellen und auch ohne Transfektion beobachtet. Alle Kontrollexperimente lieferten demnach übereinstimmende Ergebnisse.

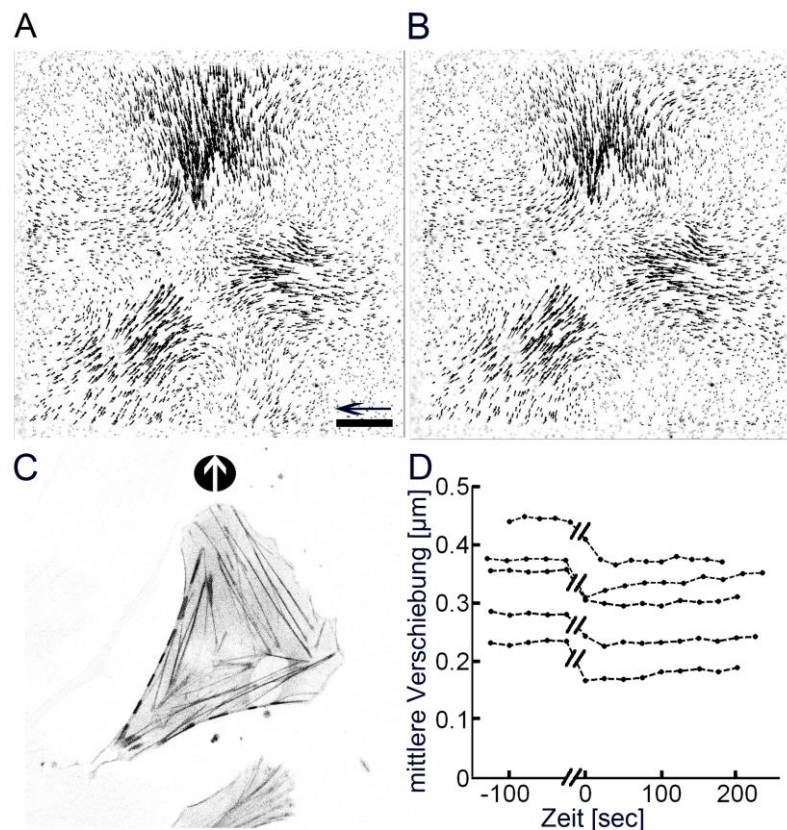


Abbildung 19. Verschiebung der Mikrostruktur, verursacht durch die Zelle vor und nach einer Dehnung. (A) Verschiebung des Substrates vor der Dehnung und (B) nach einer Dehnung. Maßstab 20 µm. Verschiebung 2 µm. (C) Position der Kanüle (schwarzer Kreis) mit der Verschiebungsrichtung (Pfeil). GFP-Aktin mit Bleichstreifen. (D) Mittlere Verschiebung am Beispiel von 5 Zellen vor und nach Dehnung. Insgesamt wurden 10 Zellen gemessen. Der Zeitpunkt null ist der Erste nach der Dehnung. Alle Zeitpunkte davor entsprechen den Verschiebungen vor der Dehnung. Die Zeit die für die Dehnung benötigt wurde, ist nicht gezeigt

3.4 Stressfaser

3.4.1 Verhalten der Stressfasern während einer von außen eingeleiteten Dehnung

Alle getesteten Proteine der fokalen Adhäsionen zeigten die gleiche Verschiebung wie das mit ihnen verbundene Substrat. Demnach erfuhr die Zelle exakt die gleiche Dehnung wie das Substrat. Bei der Dehnung behielten die FAen ihre Größe und ihre Form. Die in der Peripherie der Zellen befindlichen FAen waren mit Stressfasern verbunden. Es wurde untersucht, in wie weit sich die Dehnung der Zelle auf die Stressfasern überträgt. Dazu wurden Myofibroblasten auf mikrostrukturierten Elastomersubstraten untersucht. Um die Stressfasern zu analysieren, wurden die Zellen mit GFP-Aktin transfiziert. Es wurden nur Stressfasern analysiert, die an ihren Enden mit fokalen Adhäsionen verbunden waren.

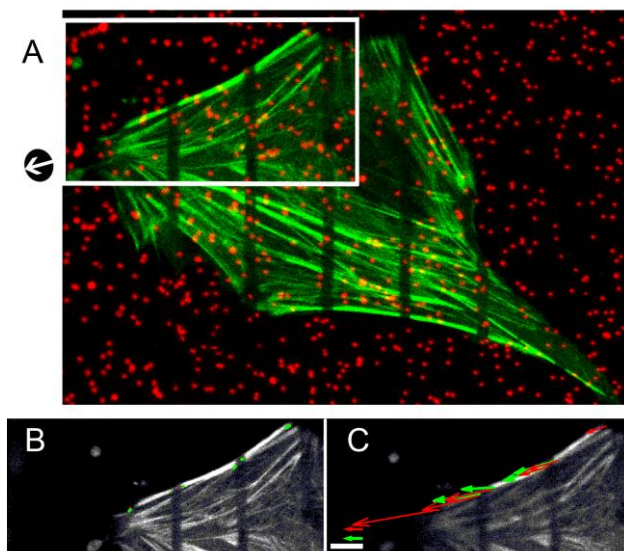


Abbildung 20. Mechanisch gedehnte Stressfasern. (A) Myofibroblasten wurden mit GFP-Aktin (grün) transfiziert und auf mikrostrukturierte Elastomersubstrate (rot) ausgesät. Ein Deformationsfeld wurde an der linken Seite der Zelle mechanisch durch eine Kanüle (schematisch schwarzer Punkt) eingeleitet. Die Auslenkungsrichtung ist mit einem weißen Pfeil skizziert. (B und C) Die Verschiebung entlang einer Stressfaser wurde vor dem Einbringen einer Dehnung (B) und unter maximaler Dehnung (C) ermittelt. Die Verschiebung durch die Deformation ist als Pfeil dargestellt. In den Stressfasern wurden die Verschiebungen der Bleichstreifen und im Substrat zusätzlich die Verschiebung der Endpunkte ermittelt. Maßstab 20 μm , Verschiebung 2 μm .

Die analysierten Stressfasern sollten eine möglichst große Unabhängigkeit von Vernetzungen mit dem Zytoskelett aufweisen. Deshalb wurden nur die deutlichen Stressfasern der Zellperipherie analysiert. Die Strecke zwischen den beiden Enden einer Stressfaser erfuhr eine Dehnung durch die eingebrachte Deformation im Substrat. Um die Verschiebung im Filament zu beobachten, wurden kleine Bereiche in der Stressfaser ausgebleicht. Möglichst kleine Flächen wurden mit gerade ausreichender Intensität gebleicht, um Schaden durch Phototoxizität zu vermeiden. Bei jeder Stressfaser wurde die Verschiebung des Substrates von Endpunkt zu Endpunkt betrachtet. Die Verschiebung der Stressfasern wurde anhand der Position von ausgebleichten Kanten bestimmt (Abbildung 20). Leider war es nicht möglich, die Verschiebung der auslaufenden Enden einer Stressfaser zu bestimmen. Dort wurde das Signal zu Rausch – Verhältnis so schlecht, dass keine Positionsbestimmung möglich war. Es wurde gezeigt, dass die

Verschiebung im Substrat deutlich, über die Länge der Stressfaser abnimmt. Die Verschiebung des inneren Teils der Stressfaser zeigt deutliche Unterschiede zu der Verschiebung im Substrat. Im inneren Teil der Stressfaser ist die Verschiebung fast gleich bzw. zeigt zum Teil einen leichten Abfall (Abbildung 21).

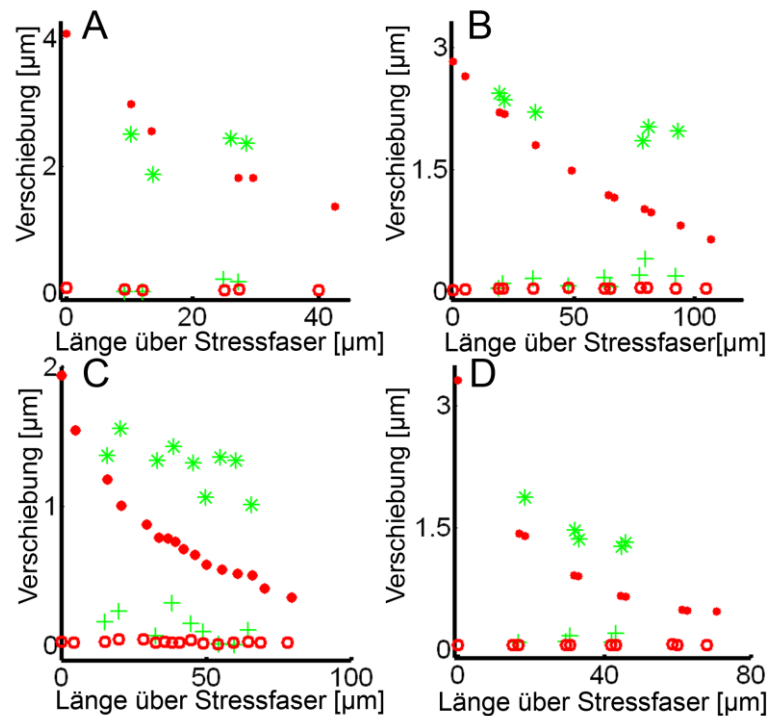


Abbildung 21. Der innere Teil von Stressfasern dehnt sich wenig bei einer mechanischen Dehnung des Elastomersubstrates (A-D) Einzelne kortikale Stressfasern wurden wie in **Abbildung 20** mit gebleichten Streifen markiert. Die Verschiebung entlang der Stressfaser (grün) und des Substrat (rot) wurde vorher (Kreuz und offener Kreis) und bei maximaler Deformation (Stern und geschlossener Kreis) gemessen.

Wenn sich die Stressfaser zwischen den Endpunkten wie eine elastische Feder verhalten würde, wäre der Abfall in der Verschiebung linear (**Abbildung 22** grün gepunktet). Die Endpunkte wären mit einer Geraden verbunden. Die gesamte Dehnung zwischen den Endpunkten würde sich in der Stressfaser verteilen. Dieses Verhalten wurde auf 100% gesetzt. Bei einer völlig steifen Stressfaser wäre die Verschiebung überall gleich. Im Filament selbst würde keine Dehnung stattfinden, dieser Fall wurde auf 0% gesetzt (**Abbildung 22** blau gestrichelt). Die Dehnung geschieht im Falle einer völlig steifen Stressfaser nur an den Enden. Im Fall, dass die Dehnung an den beiden Enden gleich ist, ist die Verschiebung der Stressfaser genau halb so groß wie die mittlere Verschiebung der Endpunkte. Auf der der Kanüle zugewandten Seite bewegt sich die Stressfaser weniger als das Substrat (grau hinterlegt) und auf der Kanüle abgewandten Seite mehr als das Substrat.

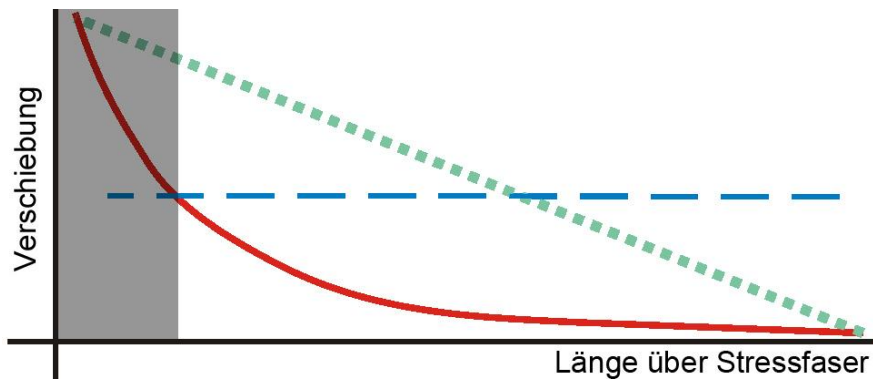


Abbildung 22. Verschiebung von Substrat und Stressfaser bei einer Dehnung. Die Stressfaser ist an ihren beiden Endpunkten mit dem Substrat verbunden. Wenn die Stressfaser eine elastische Feder wäre, würden wir eine Linie von End- zu Endpunkt erwarten (grün gepunktet; 0% Dehnung). Wäre die Stressfaser vollkommen steif, würde sie nicht gedehnt und man würde überall die gleiche Verschiebung messen (blau gestrichelte Linie; 100% Dehnung). Die abfallende Deformation im Substrat, über die Länge eines Filaments, entspricht ungefähr einem exponentiellen Abfall (rot). Die genaue Form des Abfalls hängt stark von der räumlichen Lage des Filaments im eingeleiteten Deformationsfeld ab.

Stressfaser	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dehnung in der Stressfaser	48%	30%	24%	22%	21%	12%	-13%	-18	-22%

Tabelle 2 Gezeigt ist, wie viel Prozent der Dehnung innerhalb einer Stressfaser stattfindet. Es wurden neun Stressfasern von unterschiedlichen Zellen untersucht. Der Mittelwert der Dehnung, die innerhalb einer Stressfaser stattfand, entsprach 12%.

In neun verschiedenen Zellen wurde eine große Variation von Dehnungen in den Filamenten ermittelt. Es wurde aber immer beobachtet, dass der größte Teil der Dehnung in der Verbindung zu den fokalen Adhäsionen stattfindet. Bei einer Dehnung werden die Stressfasern im Mittel um nur 12% gedehnt.

3.4.2 Die Stressfaserenden

Die Zelle ist bei einer Dehnung fest über die fokalen Adhäsionen mit dem Untergrund verbunden. Eine Dehnung überträgt sich aber nur zum Teil auf den inneren Teil einer Stressfaser. Der größte Teil der Dehnung findet in der Verbindung der Enden mit den FAen statt. Die Verschiebung der Stressfaser bei einer Dehnung ist im überwiegenden mittleren Teil der Stressfaser deutlich größer als die des Substrates. Im Bereich der Stressfaser, welcher der Kanüle zugewandt ist, müssen die Verschiebungen geringer sein, als die der Endpunkte (**Abbildung 22** grau hinterlegt).

Um dieses zu analysieren, wurden Myofibroblasten mit einem roten fokalen Adhäsionsmarker und GFP-Aktin transfiziert. Es wurden unmarkierte Elastomersubstrate ohne fluoreszierende

Oberflächenmarkierung verwendet. Bei einer Dehnung der Zelle sollten sich die beiden Enden einer Stressfaser ungefähr gleich stark dehnen. Für dieses Experiment wurden nur die Enden von Stressfasern und ihre Kopplung mit den FAen betrachtet.

Für die Positionsbestimmungen in den Stressfasern wurden wieder kleine Bereiche ausgebleicht. Dieses erfolgte jetzt in der Nähe der fokalen Adhäsion (Abbildung 23 A). Bleichstreifen wurden zur Verschiebungsanalyse, senkrecht zu den Stressfaser und der Richtung der eingeleiteten Deformation, erzeugt.

Für die Analyse wurden ein 10 Bildpunkte breiter Ausschnitt, längs zu den Bleichstreifen, für den jeweiligen Kanal (grün und rot) gemittelt. Diese gemittelten Streifen wurde über die Zeit betrachtet (Abbildung 23 unten). Nach einer Wartezeit (ca. 2 min) wurde von Bild zu Bild eine immer größer werdende Deformation eingeleitet. (Abbildung 23 C).

Es ist zu erkennen, dass der Abstand, bei maximaler Dehnung der Zelle, zwischen den ersten Bleichstreifen der Stressfaser und der fokalen Adhäsion zunimmt. (Abbildung 23 B). Die Verschiebungen der fokalen Adhäsion nahmen viel schneller zu, als die der verfolgten Bleichstreifen innerhalb der Stressfaser. Unterschiedliche Bleichstreifen in einer Stressfaser bewegen sich gleich weit, obwohl sie 5 μm oder 25 μm von der FA entfernt waren. Nur das Ende der Stressfaser, welches mit der fokalen Adhäsion verbunden war, erfuhr eine Dehnung. Das gegenteilige Verhalten konnte für den, der Kanüle abgewandten Bereich gezeigt werden. Dort bewegten sich die Stressfaser deutlich mehr, als die fokalen Adhäsionen am Ende. Dieses wurde in 10 unabhängigen Zellen gezeigt.

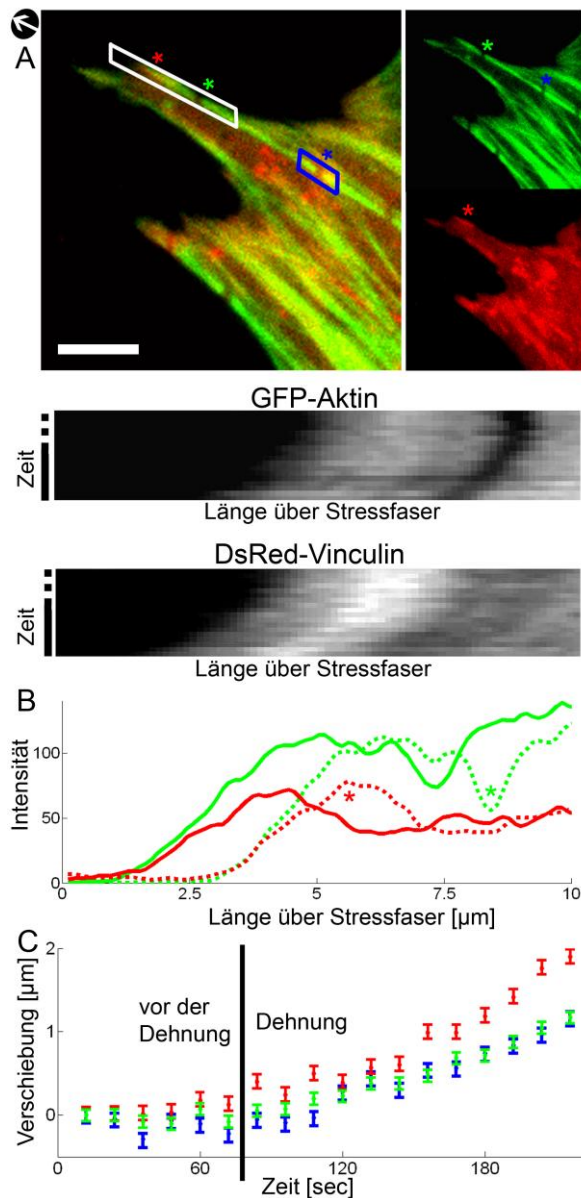


Abbildung 23. Der Abstand zwischen fokalen Adhäsionen und den Enden der Stressfaser bei einer Dehnung der Zelle. (A) Myofibroblasten wurden gleichzeitig mit GFP-Aktin (grün) und DsRed-Vinculin transfiziert (rot). Das Elastomersubstrat wurde durch eine Kanüle (schwarzer Punkt) in Pfeilrichtung deformiert. Maßstab 10 μm . Senkrecht zu den Bleichstreifen wurde ein Profil erstellt (A unten): Profil von GFP-Aktin und DsRED-Vinculin aus der weißen Umrandung von A (oben), über die Zeit. Vor der Deformation (gepunktet) und bei der in Stufen eingeleiteten Deformation (durchgezogen). (B) Intensität der Profile über die Länge. Zu den Zeitpunkten vor der Deformation (gepunktet) und bei maximaler Deformation (durchgezogen). (C) Bestimmung der Verschiebung der FAen (rot, Sternchen in A) und der Bleichstreifen (grün und blau, Sternchen in A). Der angegebene Fehler ist die Standardabweichung der Verschiebung ohne Dehnung der Zelle. Sie beinhaltet die normale Bewegung der Zelle und die Ungenauigkeit der Verschiebungsanalyse.

3.4.3 Verlängerung der Enden der Stressfaser

Bei der Dehnung einer Zelle befindet sich der größte Anteil der Deformation in der Verbindung zwischen FAen und den Enden der Stressfasern. Dieser Verlängerung können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen.

Eine Vermutung, die es zu klären galt, war, ob sich die Enden durch Polymerisation verlängern. Um dies genauer zu analysieren, wurden Myofibroblasten mit GFP-Aktin transfiziert. Die Zellen wurden wieder durch eine mechanische Deformation des Substrates gedehnt. Die Enden von gedehnten Stressfasern wurden vor und unter Dehnung, beobachtet. Dabei wurde ein Teil der Enden komplett ausgebleicht. Ein Ausbleichen der Enden vor der Dehnung führt zu einem Verlust des Signals während der Dehnung. Nicht gebleichte Enden zeigen dabei ein Signal und verlängern sich wie vorher beschrieben.

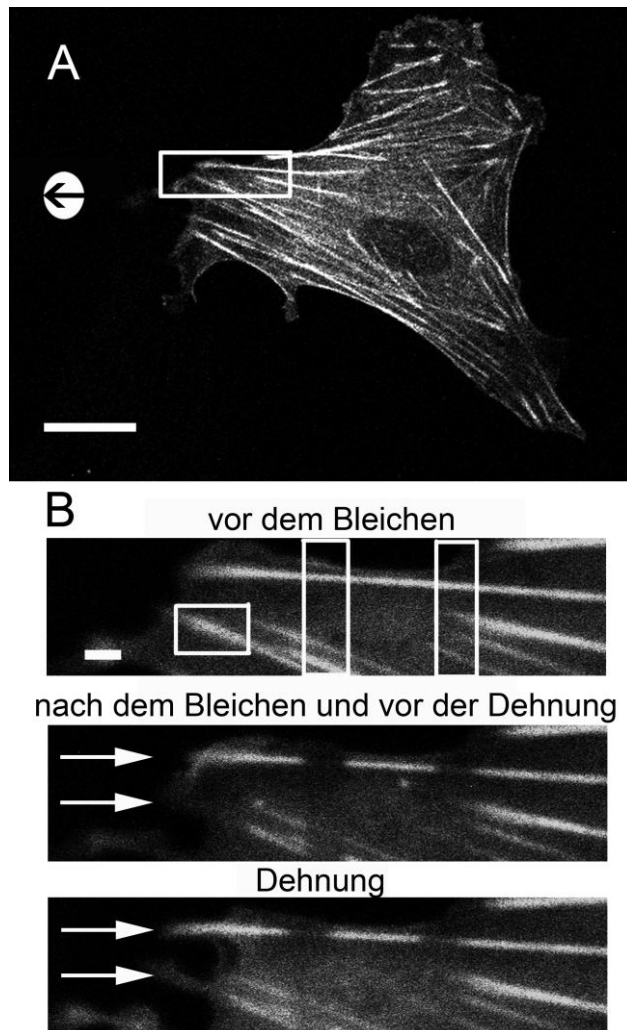


Abbildung 24. Verhalten von Aktin an den Stressfasernenden bei einer Dehnung. (A) Myofibroblasten wurden mit GFP-Aktin transfiziert und auf Elastomersubstrat kultiviert. Der Kreis markiert die Position der Einleitung der Deformation und der Pfeil die Richtung. Maßstab 20 µm. (B vor dem Bleichen) Ausschnitt von A mit den Enden von zwei Stressfasern. Maßstab 2 µm. (B nach dem Bleichen und vor der Dehnung) Nach dem Ausbleichen der in B oben markierten rechteckigen Bleichfelder. (B Dehnung) Während der Dehnung der Stressfasern. (Pfeil oben) Die obere Stressfaser wird verlängert. (Pfeil unten) Die untere Stressfaser wurde auch verlängert, zeigte aber kein Signal in der Verlängerung.

3.4.4 Verformung der Stressfaserenden nach einer Dehnung

Wenn eine Zelle gedehnt wurde, reagierte sie zum Teil plastisch. Sie verloren also ein wenig ihrer Möglichkeit, das unterliegende Substrat zu deformieren. Vor der Dehnung zogen sie das Substrat etwas mehr zusammen, als nach einer Dehnung. Die Dehnung an den Stressfaserenden war somit nicht vollständig elastisch. Es blieb eine plastische Verlängerung in der Zelle nach einer Dehnung zurück.

Es wurde das Verhalten der Stressfaser bei der Reduktion der Zellkraft analysiert, indem die Verschiebung innerhalb, vor und nach einer Dehnung beobachtet wurde (Abbildung 25 A und B). Die Enden der Stressfasern wurden vor und nach einer Dehnung verglichen (Abbildung 25 C und D). Das Signal der Stressfasern zum Ende verändert sich kaum. Die Positionen der auslaufenden Enden sind vor und nach der Dehnung nahezu identisch. Durch die Dehnung der Zelle entfernen sich die Bleichstreifen jeweils vom Ende. Zum Teil hat dieses zur Folge, dass die Stressfaserenden zur Mitte hin kontrahieren.

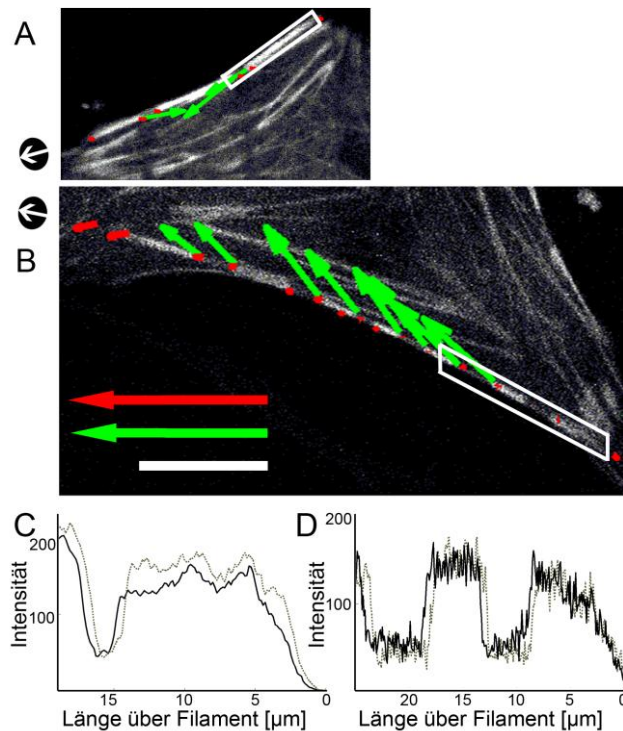


Abbildung 25. Der innere Teil einer Stressfaser kontrahiert nach einer Dehnung. Myofibroblasten wurden mit GFP-Aktin transfizierte und auf mikrostrukturierten Elastomersubstraten ausgesät. (A) Gezeigt ist nur das GFP-Signal. Im inneren Teil einer Stressfaser wurden Streifen ausgebleicht und die Position bestimmt. Verschiebung des inneren Teils einer Stressfaser, nach einer Dehnung der Zelle, ermittelt. Es wurde die Verschiebung zeigt immer von den Enden der Stressfasern zur Mitte (grüne Pfeile). Die Verschiebung im Elastomersubstrat nach einer Dehnung (rote Pfeile). Maßstab 20 μm . Verschiebung 2 μm . (C und D) Profil aus den weißen Rechtecken aus Abbildung A und B. Profil vor einer Dehnung (grau) und nach einer Dehnung (schwarz). N=8

3.5 Die Prozesse an den Stressfaserenden können nicht aufgelöst werden

Die mechanischen und molekularen Grundlagen der Dehnung der Stressfaserenden wurden genauer analysiert. Myofibroblasten wurden wie in Abschnitt 3.4 behandelt. Die Verlängerung am Ende der Stressfasern könnte durch eine Verformung im Aktin-Netzwerk hervorgerufen werden. Dieses würde eine Bewegung von Aktin innerhalb der Stressfaser zur Folge haben. Nur sehr kleine Ausschnitte am Ende der Stressfasern wurden betrachtet. Sehr kleine Bleichstreifen wurden verwendet, deren Breite unterhalb der erwarteten Dehnung der Zelle gewählt wurde. Wenn die Verlängerung durch eine Verschiebung der Aktinfilamente innerhalb der Stressfaser hervorgerufen würde, müssten die Bleichstreifen am Ende einer Stressfaser, durch das aneinander vorbeigleiten einzelner Aktinfilamenten, verwischen. Bleichstreifen in Bereichen ohne Dehnung wären davon unbeeinflusst. Profile entlang einer Stressfaser wurden vor und während einer Dehnung aufgenommen (Abbildung 26). Während einer Dehnung bewegt sich die FA deutlich (vergleiche A2 B2 rot). Selbst ein Bleichstreifen innerhalb einer fokalen Adhäsion zeigt während einer Dehnung kein deutlich erhöhtes Signal, im Vergleich zu den weiter innenliegenden Bleichstreifen (B2 grün). Das Signal wurde zum Ende hin ein wenig schwächer.

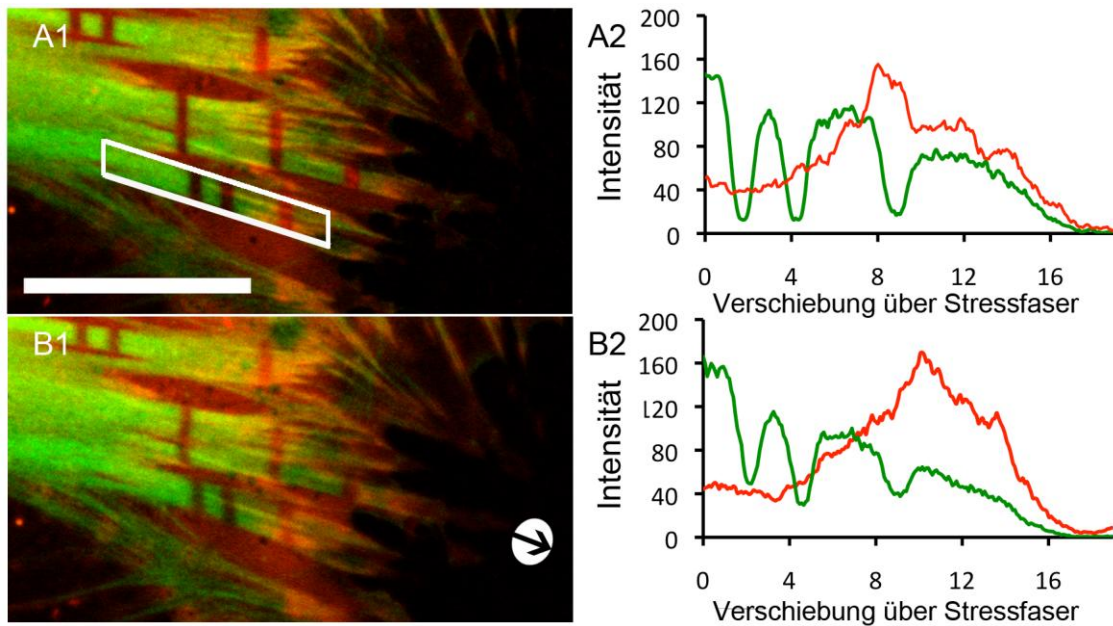


Abbildung 26. Verhalten von Bleichstreifen während einer Dehnung. (A1) Myofibroblasten wurden mit GFP-Aktin (grün) und DsRed-Vinculin (rot) transfiziert und ein Profil (A2) aus der Markierung erzeugt. Maßstab = 20 μm . (B1) Bei einer Dehnung in Pfeilrichtung durch eine Kanüle (Kreis). Im Profil bewegt sich die FA in Richtung der Kanüle. Die Bleichstreifen zeigen eine deutlich geringere Verschiebung. Das Verhältnis der Signale von gebleichten zu ungebleichten Stellen im Aktin bleibt überall gleich.

Die genaue molekulare Verbindung von Stressfasern mit den fokalen Adhäsionen ist nicht geklärt. Auch ist wenig über die Art und Unterschiede der Kreuzvernetzung und Verankerung einer Stressfaser bekannt. Die optische Auflösung des LSM zeigt keine klaren Strukturen im Bereich der Enden der Stressfasern. Um in zukünftigen Experimenten dieser Fragestellung mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopietechnik nachgehen zu können, wurde damit begonnen eine hochmoderne Mikroskopietechnik, dSTORM, zu etablieren. Um im weiteren die Genauigkeit der Positionsbestimmung analysieren zu können, wurden die nötigen Kalibrierungsmessungen durchgeführt und Softwareprogrammierungen abgeschlossen.

Es wurde eine neuartige Technik etabliert um die Auflösung in der Lichtmikroskopie zu verbessern.

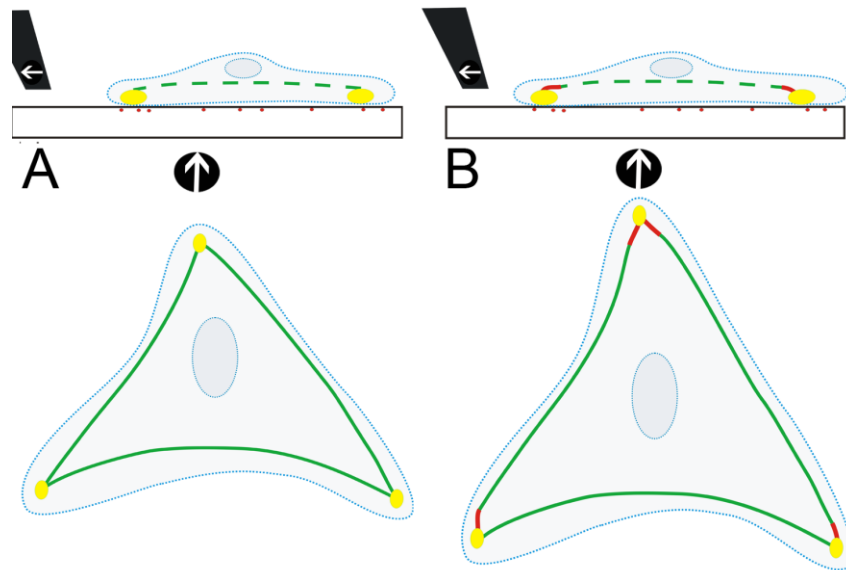


Abbildung 27. Schematisches Verhalten von Zellen vor einer Dehnung (A) und nach einer Dehnung (B). Die Umrandung der Zelle (gepunktet) mit fokalen Adhäsionen (gelb) und gebundenen Stressfasern (grün) in der Peripherie der Zelle. Zwischen A und B fand eine Dehnung mit einer Kanüle (schwarz) statt. Nur gedehnte Stressfasern wurden in den Enden verlängert (rot).

Die verbesserte Auflösung von dSTORM beruht auf der Bestimmung der Position des Mittelpunktes einzelner beugungsbegrenzter Punkte. Die Genauigkeit hängt somit nicht nur von den Bildinformationen ab, sondern auch von der Güte der Positionsbestimmung. Die Analyse der Genauigkeit der verwendeten Methode wurde im Weiteren analysiert.

3.6 Simulation der Positionsbestimmung unter optimalen Bedingungen in der dSTORM

Die Bestimmung der Position von beugungsbegrenzten Punkten wird, unter anderem, durch das Signal zu Rausch-Verhältnis des Systems limitiert. Um diese Limitierung des Messsystems zu bestimmen, musste zunächst das Rauschen des Systems gemessen werden um im Weiteren die Genauigkeit der Positionsbestimmung analysieren zu könne. Das Hintergrundsignal der Kamera betrug im Mittel 280 Grauwerte bei maximalen Grauwerten von 16-Bit.

Durch das Messen eines konstanten Fluoreszenzsignals konnte das Dunkel-, Photonen- und Kamerarauschen bestimmt werden. Obwohl das Photonenrauschen eigentlich mit der Zunahme des Signals sinken müsste, überwiegt hier anscheinend das Rauschen, welches über das Auslesen der Kamera entsteht.

Aufnahmezeit	mittleres Signal
10 ms	241
50 ms	257
100 ms	277
200 ms	308
300 ms	316

Tabelle 3. Dunkelsignal der Kamera

Aufnahmezeit	mittleres Signal	Standartabweichung des Signals
10 ms	$0,96 \cdot 10^3$	100
20 ms	$2,95 \cdot 10^3$	372
40 ms	$5,49 \cdot 10^3$	710
45 ms	$6,03 \cdot 10^3$	783
50 ms	$6,56 \cdot 10^3$	839
55 ms	$7,05 \cdot 10^3$	865

Tabelle 4. Photonen-, Dunkel- und Kamerarauschen

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bestimmt die statistische Abweichung der gemessenen Positionen der synthetisch erzeugten Abbildungen, von der vorgegebenen Position. Wie man am Ergebnis der Simulation erkennen kann (Abbildung 28). In Ergebnis zeigten alle Positionen eine maximale Abweichung von ± 3 nm auf.

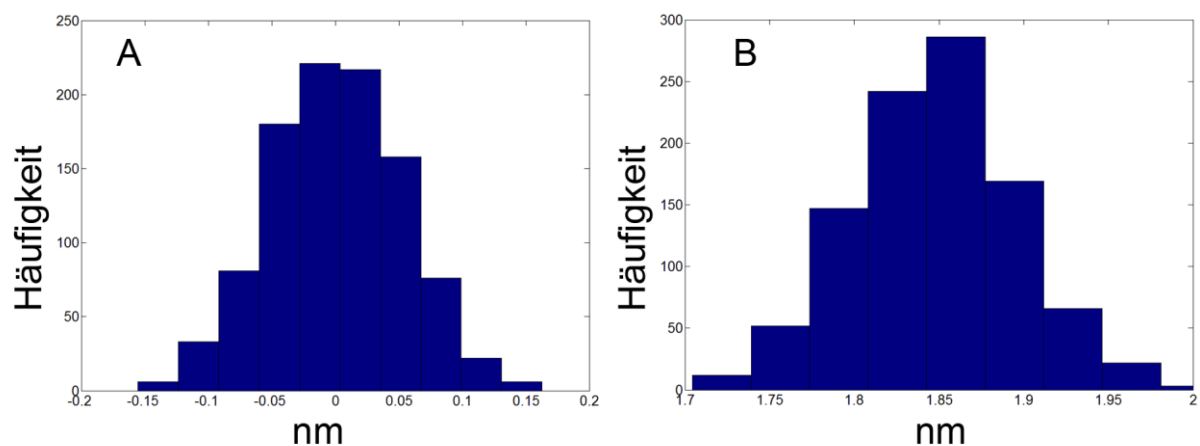


Abbildung 28. Abweichung der Positionsbestimmung. (A) Schwarzes Kreuz ist die festgelegte Position. Blauer Stern ist die Position des Scheitelpunktes aus der angelegten Gaußkurve. Maßstab 1 μm . (X und Y) Histogramm der Abweichung in x- und y-Richtung der festgelegten Position zur gemessenen Position des Scheitelpunktes. N = 1000

3.7 dSTORM Kontrollmessungen

Es wurde getestet, ob die Positionen sehr naheliegender Antikörper mittels dSTORM getrennt voneinander aufgelöst werden können. Hierzu wurden Antikörper mit

fluoreszierenden Farbstoffen auf Glasbodenschalen aufgebracht und 5 min mit 100% Laserleistung ausgebleicht (Abbildung 29 C).

Da sich die Probe innerhalb der Aufnahmezeit bewegt, wurde zusätzlich zu Antikörperbeschichtung, um diese Bewegung zu ermitteln und zu korregieren, fluoreszierende Kugeln aufgebracht (Abbildung 29 B). Mit Hilfe einer synthetischen Abbildung einer zweidimensionalen PSF (Abbildung 29 A) wurden die tatsächlichen Abbildungen einer zweidimensionalen PSF, für jede Farbe (Abbildung 29 D und E), bestimmt.

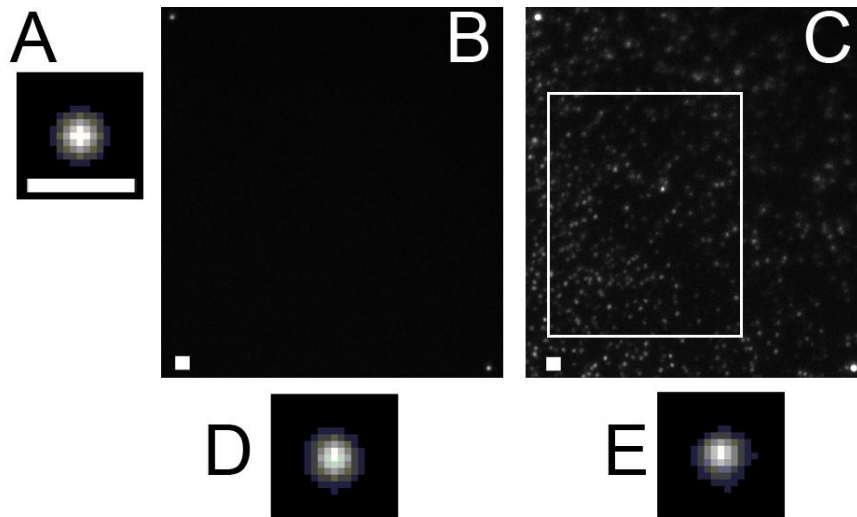


Abbildung 29. Aufnahme von physisorbierten fluoreszierenden Kugeln (B) und Antikörper mit Atto 550 nm Farbstoff bei einer Verdünnung von 10^{-5} (C). Das Bild wurde mit einer synthetischen PSF (A) kreuzkorreliert. Dadurch konnte aus dem Bild die enthaltene PSF (D von B und E von C) extrahiert werden. Maßstab 1 μm .

Mit Hilfe der tatsächlichen zweidimensionalen PSF wurden die groben Positionen der Kugeln und des Antikörpers bestimmt. Mit Anlegen einer Gaußkurve wurden hier die exakten Positionen bestimmt.

Über die Bewegung aller Kugeln während der Aufnahmedauer wurde die Bewegung der Probe ermittelt. Zur Kontrolle wurde die Bewegung pro Zeitschritt von der tatsächlichen Position jeder Kugel abgezogen (Abbildung 30 rot). Im Idealfall sollte die Position der Kugeln, nach der Korrektur, in einem Punkt liegen, dessen Breite nur durch das Rauschen des Systems beeinflusst wird (Abschnitt 1.4.4). Es wurden nur Aufnahmen analysiert, bei denen die Korrektur der Kugeln eine ähnliche Größenordnung, wie in Abbildung 30 in rot gezeigt, aufwies und bei denen alle Positionen in x- und y-Richtung eine maximale Streuung von ± 15 nm zeigten.

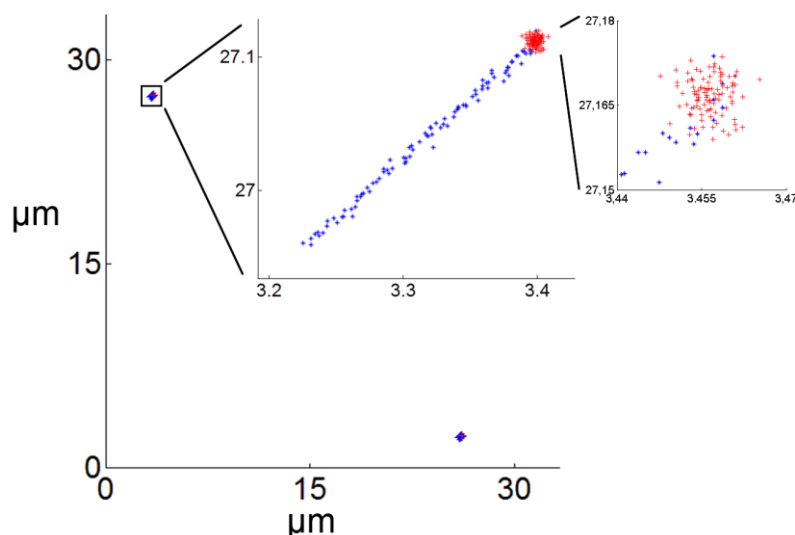


Abbildung 30. Positionsbestimmung der Kugel aus **Abbildung 29** über die Zeit. Position der fluoreszierenden Kugeln (blauer Stern) über die Aufnahmezeit (5 min). Alle Positionen mit der Korrektur der mittleren Bewegung aller verfolgten Kugeln (rote Kreuze).

Um zu testen, auf welche Distanz sich die Positionen einzelner Antikörper noch getrennt von einander bestimmen lassen, wurden Oberflächen unterschiedlich dicht mit fluoreszierenden Antikörpern beschichtet. Sehr dicht markierte Oberflächen sollten ein gleichmäßiges Bild ergeben. Es wurden Antikörper mit dem Farbstoff Atto 550 in verschiedenen Verdünnungen auf Glasbodenschalen aufgebracht (**Abbildung 31**). Nur Bereiche ohne Kugeln wurden betrachtet (z.B. **Abbildung 29 C** weiße Umrandung). Obwohl sich die Verdünnung über drei Größenordnungen bewegten, wurde bei den ersten drei Verdünnungen fast die gleiche Anzahl an Punkten gemessen. Darüber hinaus waren diese auch nicht gleichmäßig im Bild verteilt. Erst eine sehr hohe Verdünnung von 10^{-7} führte zu einer Reduktion der Anzahl der gefundenen Punkte.

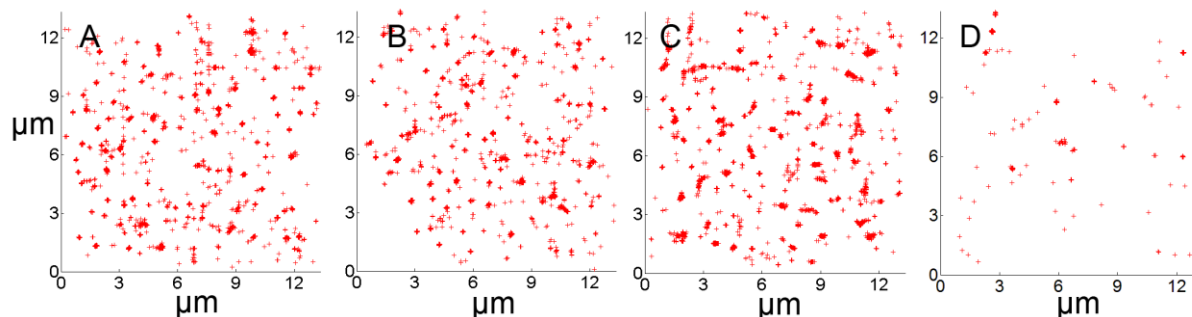


Abbildung 31. Positionsbestimmung von Antikörpern mit Atto 550 Farbstoff in 500 Aufnahmen. Verschiedene Konzentrationen wurden physisorbiert (A $1:10^{-2}$, B $1:10^{-3}$, C $1:10^{-5}$, D $1:10^{-7}$)

	A	B	C	D
Verdünnung von Antikörper Atto 550	$1:10^{-2}$	$1:10^{-3}$	$1:10^{-5}$	$1:10^{-7}$
Anzahl der Punkte in 100 Aufnahmen	6707	5542	5072	69

Tabelle 5. Anzahl der ermittelt Position in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration aus **Abbildung 31**.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein System entwickelt, um Zellen in einem Deformationsfeld zu dehnen. Eine Zelle ist dabei fest über ihre FAen mit der EZM verbunden. Die Stressfaserenden wurden als Bereiche identifiziert, die sich dabei plastisch verformen. Die Kraft der Zelle wird durch diese plastische Verformung reduziert. Es konnte geklärt werden, dass die auftretende Dehnung der Enden nicht durch Polymerisation von Aktin hervorgerufen wird. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Ursache der plastischen Verformung unterhalb der Auflösung von klassischen Lichtmikroskopen zu suchen ist. In diesem Zusammenhang wurde damit begonnen eine hochauflösende lichtmikroskopische Technik, die dSTORM, zu etablieren. In den folgenden Kapiteln erfahren die Ergebnisse eine umfangreiche Interpretation und Betrachtung im aktuellen Kontext der Wissenschaft.

4.1 Die FA sind fest mit der EZM verbunden

In dieser Arbeit wurde die Kopplung der FA zur EZM bei einer aktiven Dehnung analysiert. Als EZM dienten hier Elastomersubstrate. Die Zellen wurden innerhalb von ca. 2 min um bis zu 4% gedehnt. Um das viskose Verhalten möglichst gering zu halten, wurde das Substrat schrittweise verformt, so konnte gewährleistet werden, dass sich das Elastomersubstrat während der Aufnahme nahezu im Gleichgewichtszustand befindet. Die gemessene Verschiebung im Substrat, ohne einen mechanischen Einfluss, spiegelt die Auflösungsgenauigkeit des Messsystems wieder. Die Bewegung von fokalen Adhäsionen ist in Bezug zu der Bewegung der darunterliegenden EZM, während der Dehnung der Zelle, im Bereich des Auflösungsvermögens des Messsystems, gleich.

So konnte gezeigt werden, dass die Verbindung der FA zur EZM steif ist, sowohl vor als auch während einer Dehnung des Substrates.

Alle getesteten Proteine zeigten dieses Verhalten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch die Kopplungen innerhalb von fokalen Adhäsionen steif sind. Die Zelle erfährt demnach exakt die gleiche Dehnung, welche in das Elastomersubstrat von außen mechanisch eingeleitet wird.

Eine gelöste Kopplung von Komponenten wurde, ohne eine mechanische Beeinflussung von außen, von den FA zur EZM (Smilenov et al. 1999) oder innerhalb einer FA (Hu et al. 2007) nachgewiesen und in einem Zeitraum über 15 min beobachtet. Eine Erhöhung der Spannung, die auf eine FA wirkt, stabilisiert die Kopplung und eine feste Verbindung innerhalb der FA wird erzeugt (Aratyn-Schaus et al. 2010).

Die im Experiment untersuchten FA übertragen große Kräfte in die EZM. Dieses führt anscheinend zu einer steifen Verbindung der FA zur EZM und innerhalb der FA.

4.2 Die Kraft der Zelle nach einer Dehnung

Im Experiment wird über die Verschiebungen des Elastomers eine Kraft auf Zellen und ihre fokalen Adhäsionen ausgeübt. Durch aktive Reduktion der Deformation ist der viskose Anteil des Elastomers, bei einer Aufnahme Frequenz von ca. 10 sec, nicht messbar. Das Elastomer wies demnach keine messbare Plastizität auf. Somit wurde sichergestellt, dass durch das Erreichen eines Ruhezustandes, Rückschlüsse auf vorherige Kräfte, welche den Elastomer verformt haben, bestimmt werden können. Dadurch kann die Kraft, die auf die Zelle wirkte, abgeschätzt werden. Durch die Verschiebung der Kanüle wurde eine Kraft in die Oberfläche eingeleitet und dadurch Bereiche lateral verschoben.

Wird eine Fläche von $10 \mu\text{m}^2$ in der Oberfläche eines Elastomers, mit dem gemessenen E von 14 kPa und $\nu = 0,5$, um $1 \mu\text{m}$ verschoben, wird davon ausgegangen, dass hierfür eine Kraft von ungefähr 35 nN benötigt wird (Merkel et al. 2007).

Die Zellen können einen Elastomer auch selber verformen. Über die Kräfte, die dabei auftreten, kann abgeschätzt werden ob, bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, naturnahe Kräfte auf die Zellen ausgeübt wurden, ohne die Zellen dabei zu schädigen. Experimente, wie z.B. die Verschiebung mikrostrukturierter Elastomere (N Q Balaban et al. 2001) oder das Biegen von, aus Elastomer bestehenden Mikronadeln (Tan et al. 2003), wurde ein linearer Zusammenhang von $2,0\text{--}5,5 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ zwischen Kraft und Fläche einer FA gemessen.

Vergleicht man die Ergebnisse, erkennt man, dass die, im Experiment, auf die Zellen ausgeübten Kräfte in der gleichen Größenordnung liegen, wie die Kräfte, die von den Zellen selbst ausübt werden, wodurch eine Schädigung der Zellen, während des Experiments eher unwahrscheinlich erscheint.

Vor einer Dehnung der Zellen, zeigt jede Zelle eine konstante Kraft, die zu einer konstanten Verformung des Elastomersubstrates führt. Nach einer Dehnung der Zelle, ist die Kraft der Zellen leicht reduziert. Sie verformen aber immer noch deutlich den Elastomer. Innerhalb eines Zeitraumes von 3 min, in der die Zellen nach der Dehnung beobachtet wurden, ist keine messbare Erholung der, durch die Zelle erzeugten, Kraft zu erkennen.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Spannung, die von Zellen aufgebaut wird, aktiv in einem konstanten Gleichgewicht gehalten wird (Mizutani et al. 2004). Durch eine von außen eingeleitete mechanische Dehnung wird diese Homöostase gestört. Nach einer Dehnung ist die Kopplung zwischen der Krafterzeugung durch Myosin innerhalb der Stressfasern und der EZM aber immer noch gegeben. Bei einer Zerstörung von Kopplungen hätte die Zelle nicht mehr die Möglichkeit einer Krafterzeugung in die EZM (Kumar et al. 2006).

Die Reduktion der Kraft in der Zelle wird als ein rein passiver Vorgang innerhalb der Zellen angenommen, denn die schnelle Reduktion der Kraft macht eine aktive Reaktion der Zelle unwahrscheinlich. Die Reduktion geschieht noch bevor die Zelle selber, mit einem sichtbaren

Phänotyp, wie z.B. dem Ausrichten des Zytoskeletts, auf eine einwirkende Kraft reagieren kann. Es wird vermutet, dass über längere Zeiträume die Kraft der Zellen wieder zunimmt, um die Homöostase wieder herzustellen (Mizutani et al. 2004). Die Zellen werden zusätzlich auf den mechanischen Reiz z.B. mit einem Ausrichten der Stressfasern reagieren (Kaunas et al. 2006). Erfährt eine Zelle eine leichte Erhöhung der Spannung durch eine Dehnung, führt dies zu einer plastischen Deformation der Zelle. Die hier beobachteten, mechanisch aktiven Zellen, können einer Erhöhung der Spannung nichts entgegensetzen.

4.3 Die Verlängerung der Stressfaser

Um die Kopplung von FA mit den Stressfasern zu analysieren, wurde das GFP-Aktin-Signal während einer Dehnung beobachtet. Es wurden nur die deutlichen Stressfasern, welche die Umrisse einer Zelle markieren, betrachtet, weil hier die größte Unabhängigkeit von anderen Teilen von Mikrofilamenten vermutet wird. Zudem ist beschrieben, dass diese Stressfasern nur jeweils am Ende mit FAen verbunden sind und eine große Spannung erzeugen (Zand et al. 1989).

In dieser Arbeit konnte ein Bereich größerer Dehnung, an den Enden von Stressfasern identifizieren werden. Der mittlere Teil einer Stressfaser wird dabei kaum gedehnt. Es wird vermutet, dass unterschiedliche Zusammensetzungen der Kreuzvernetzung innerhalb einer Stressfaser dafür verantwortlich sind. Wenn eine Stressfaser gedehnt wurde, zeigten die beiden Enden eine ungefähr gleiche Dehnung auf. Die Zusammensetzung der Enden wird deshalb als sehr ähnlich angenommen.

In der Literatur wird beschrieben, dass die mechanischen Eigenschaften von Stressfasern mit der unterschiedlichen Zusammensetzung innerhalb dieser korrelieren (Colombelli et al. 2009). Die Kreuzvernetzung innerhalb von Stressfasern kann sehr unterschiedlich sein. Der genaue Aufbau kann sich z.B. zwischen adhärennten Zellen unterscheiden (J. W. Sanger et al. 1983). Wenn das ganze Aktin-Zytoskelett einer Zelle gedehnt wird, werden Proteine, wie p130Cas, an dieses gebunden. Eine kraftabhängige Konformationsänderung innerhalb des Aktin-Zytoskeletts führt hier zu einer Freilegung von Bindungsstellen (Sawada et al. 2002). Die gedehnten Enden von Stressfasern könnten so unterschiedliche Proteine, die unter anderem in der Signaltransduktion beteiligt sind, binden.

4.4 Die Grundlagen der Verlängerung der Stressfaserenden

Ein Teil der Stressfasern von Zellen wird durch Polymerisation von Aktin an der FA gebildet (N. Endlich et al. 2007). Dieses könnte auch bei der Verlängerung der Stressfaserenden durch Dehnung stattfinden.

Wenn Polymerisation für die Verlängerung von Aktin verantwortlich wäre, würden die Enden aus nichtgebleichtem Aktin der Umgebung gebildet. Das Signal der Verlängerung (Abbildung 24

B; Dehnung; Pfeil oben) käme dann von neupolymerisiertem Aktin. Vorher ausgebleichtes Aktin in den Enden (Abbildung 24 B; nach dem Bleichen und vor der Dehnung; Pfeil unten) würde keinen Einfluss auf das Signal der Verlängerung haben. In den ausgebleichten Enden wird jedoch kein Signal gemessen. Somit kann Polymerisation als Ursache für die Verlängerung ausgeschlossen werden. Nur schon vorher eingebautes Aktin wird in den Enden verlängert. Eine Verlängerung der Enden muss somit über die bereits eingebauten Aktinfilamenten und die bereits vorhandenen Kreuzvernetzer, an dieser Stelle, zustande kommen.

4.5 Die plastische Verformung der Stressfaserenden

Die Stressfasern kontrahieren in der Mitte, obwohl sich die Eckpunkte der Zelle nach außen bewegen. Die Dehnung der Stressfaserenden bleibt als plastische Verlängerung in den Stressfasern erhalten.

In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Spannung von Zellen, durch eine Aktivierung von Myosin II, zu unterschiedlichem Verhalten innerhalb einer Stressfaser führt. Die Bereiche der Enden werden dabei verkürzt, die Bereiche in der Mitte werden gedehnt (Peterson et al. 2004). Im hier beschriebenen Experiment, wurde die Spannung von Zellen nach einer Dehnung reduziert. Es wird vermutet, dass die Reduktion während einer Dehnung auftritt. Leider kann dieses während der Dehnung nicht direkt bestimmt werden, da sich hier die Deformationen im Substrat, verursacht durch die Zelle oder die Kanüle, überlagern. Bei einer Reduktion der Spannung von Zellen, werden die Enden von Stressfasern gedehnt und die Bereiche in der Mitte dabei verkürzt.

Die Reduktion der Spannung in Zellen kann weitreichende Folgen für die Zusammensetzung von FA haben. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Reduktion der Spannung, die Dichte in FA erniedrigt (C Ballestrem et al. 2001). Die Austauschkinetiken und die Phosphorylierungen von Proteinen innerhalb der FA wird unter anderem durch die Kraft beeinflusst (Möhl et al. 2009).

Wie in der Literatur beschrieben, führt eine Erhöhung der Spannung in Zellen zu einer unterschiedlichen Steifigkeit der Enden, im Vergleich zum mittleren Bereich von Stressfasern (Lu et al. 2008).

Die Verlängerung der Enden von Stressfasern ist sowohl von der Richtung, als auch von der Größe der Dehnung abhängig. Zellen sind in der Lage, auf unterschiedliche Signale, die aufgrund einer Dehnung auf die Zellen einwirken, zu reagieren. Dabei werden in der Literatur zwei unterschiedliche Extreme beschrieben: In einem Fall versucht die Zelle ihre Kraft konstant zu halten (Freyman et al. 2002), in einem anderen versucht die Zelle die Dehnung konstant zu halten (Saez et al. 2005). Innerhalb der Verlängerung der Enden der Stressfasern sind beide Signale gespeichert.

4.6 Der molekulare Aufbau der Stressfaserenden

Der genaue Aufbau der molekularen Kopplung von Stressfasern zu den FAen wird aktuell intensiv erforscht. Bei sehr kleinen Bleichstreifen konnte nicht gezeigt werden, dass sich die Aktinfilamente in den Stressfaserenden aneinander vorbei bewegen. Es könnte sein, dass zur Kopplung nur wenige Aktinfilamente benötigt werden. Der Anteil der Aktinfilamente, welcher ausschließlich zur Kopplung der Stressfasern zu den FA benötigt wird, ist im Vergleich zu dem Anteil der Aktinfilamente, welche bei der Krafterzeugung beteiligt sind, sehr gering (Patla et al. 2010). Die Verlängerung wäre dann ein Herausziehen der für die Kopplung verantwortlichen Aktinfilamente, aus dem Aktinbündel, welches bei der Krafterzeugung eine Rolle spielt.

Es sollte analysiert werden wie genau die Kopplung an die fokalen Adhäsionen aufgebaut ist, und welche Veränderung diese während einer Dehnung erfährt. Diese Strukturen konnten jedoch nicht mit dem LSM aufgelöst werden.

Um einen tieferen Einblick in diese Anbindung unter naturnahen Bedingungen zu gewinnen, wurde daher damit begonnen eine hochauflösende lichtmikroskopische Technik zu etablieren. Fokale Adhäsionen und ihre Anbindung an Stressfasern werden im Lichtmikroskop als Flächen abgebildet. Mit unterschiedlichen Techniken wurden hier bereits Strukturen unterhalb von 100 nm nachgewiesen. Es konnte zudem eindeutig gezeigt werden, dass diese Strukturen bestimmte Funktionen entscheidend beeinflussen (Selhuber-Unkel et al. 2010).

Mit hochauflösender Lichtmikroskopie wurde bereits ein geschichteter Aufbau nachgewiesen (Kanchanawong et al. 2010). Die Reihenfolge der beteiligten Proteine, von Intergin zu den Stressfasern, ähnelt der schon beschriebenen Reihenfolge der unterschiedlichen Kopplungen von Intergin zu den Stressfasern (Hu et al. 2007). Mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops³ konnte die Topographie einer fokalen Adhäsion und ihre Verknüpfungen aufgelöst werden (Franz et al. 2005). Hier zeigen sich fingerförmige Strukturen innerhalb der Aktinfilamente, die mit den Proteinen in der FA eine Verbindungen eingehen. Diese Strukturen sind im Mittel 127 ± 50 nm voneinander entfernt.

In der Theorie liegt die Auflösungsgenauigkeit der dSTORM im niedrigen Nanometerbereich. Basierend auf den in dieser Arbeit durchgeführten Kalibrierungsmessungen, liegt die Auflösungsgenauigkeit, unter realen Aufnahmebedingungen, im niedrigen zweistelligen Bereich. Dieser Unterschied wird vor allem durch erhöhtes Hintergrundsignal hervorgerufen, welches z.B. von unspezifischen Färbungen hervorgerufen wird. Die Genauigkeit der Positionsbestimmung hängt zusätzlich von der Aufnahmedauer und den An-Zeiten der fluoreszierenden Farbstoffe ab.

³ Ein Rasterkraftmikroskop kann durch eine mechanische Abtastung von Oberflächen unter anderem die Topographie mit einer Auflösung von ca. 1 nm bestimmen.

Es wurde als Erstes untersucht, in wie weit mit fluoreszierenden Antikörper markierte Flächen abgebildet werden können. Antikörper, gekoppelt mit fluoreszierenden Farbstoffen, wie sie auch für die Immunfluoreszenz verwendet werden, wurden dazu auf Deckgläser aufgebracht. Die Dicke der Schicht liegt bei einem konfokalen LSM unterhalb der Auflösungsgrenze.

Die Variation der Positionen einzelner fluoreszierender Kugeln ist nach der Bewegungskorrektur auf einen kleinen Bereich beschränkt. Diese Variation spiegelt die Auflösungsgrenze dieser Mikroskopiertechnik wieder. Da die Auflösung vor allem durch das Signal zu Rauschverhältnis bestimmt wird und dieses bei dem verwendeten Antikörper ungefähr genauso gut ist, wie bei den fluoreszierenden Kugeln, wird vermutet, dass sich die Ungenauigkeit bei der Positionsbestimmungen im selben Bereich, wie die Positionsbestimmung der Kugeln, befindet. Daher wird unter optimalen Messbedingungen eine Genauigkeit in der Positionsbestimmung von ± 15 nm erwartet.

Ob eine Struktur mit der dSTORM aufgelöst werden kann hängt darüber hinaus jedoch nicht nur mit der Genauigkeit der Positionsbestimmung zusammen. Entscheidend für die Auflösung von Strukturen ist ebenso die Dichte der Fluoreszenzmarker, mit der die Strukturen gefärbt werden. Eine unzureichende Färbungsdichte führt dazu, dass vorhandene Strukturen nicht mehr aufgelöst werden können.

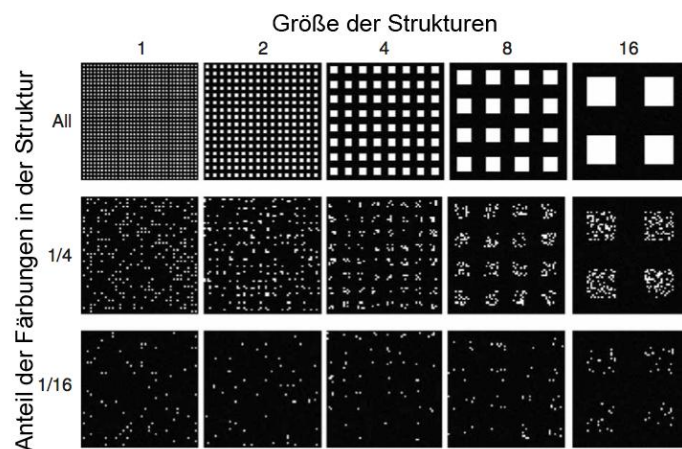


Abbildung 32. Simulation der Auflösung von Strukturen in Abhängigkeit von der Färbungsdichte. Bei niedrigen Färbungsdichten sind die Strukturen nicht mehr zu erkennen. Abbildung verändert nach (Shroff et al. 2008)

Bei der Inkubation von Glasoberflächen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Antikörpern wird ein fast linearer Zusammenhang der Dichte der Antikörper auf der Glasoberfläche mit der Konzentration erwartet (Horbett et al. 1987). Zum jetzigen Zeitpunkt konnte nicht geklärt werden, welche Beschichtungsdichten erreicht werden. Das fluoreszierende Signal unterscheidet sich aber vor dem ausbleichen der Probe um Größenordnungen. Vor dem Ausbleichen ist das Signal über die Fläche sehr homogen. Wobei diese Messung bei sehr hoher Laserleistung und damit nur bei sehr niedriger Verstärkung gemacht wurde.

Nach dem Ausbleichen zeigte sich das erwartete, reversible An- und Ausschalten der fluoreszierenden Farbstoffe. Aber es scheint so, dass hierbei nur ein kleiner Teil der gebundenen Farbstoffe beteiligt ist. Der größte Teil der Farbstoffe ist ausgebleicht oder aber die Verweilzeit, im Aus-Zustand, ist hier viel länger. Der Anteil derjenigen Farbstoffe, die in der Lage sind den Zustand zu wechseln, scheint jedoch unabhängig von der Farbstoffdichte zu sein.

Unterschiedliche An- und Auszeiten haben Einfluss darauf, welche Farbstoffdichten innerhalb einer Aufnahmezeit überhaupt detektiert werden können.

Der Zugang der einzelnen Farbstoffe zu physikalischen oder chemischen Faktoren, welche die An- und Auszeiten beeinflussen, hat auch Einfluss auf die gemessene Punktdichte in der dSTORM. Es kann z.B. durch Verspannungen im Strahlteiler zu leicht unterschiedlichen Bestrahlungsstärken innerhalb eines Bildes kommen. Diese leichten Unterschiede können schon zu erheblichen Unterschieden in den gemessenen Punktdichten im Bild führen. Leichte Unterschiede in der Bestrahlung führen schon zu sehr unterschiedlichen An- und Auszeiten.

4.7 Ausblick

Aus den Aufnahmen kann die Dauer ermittelt werden, die ein fluoreszierender Farbstoff in den An- oder Aus-Zuständen verbringt. Die Parameter, die im Experiment darauf Einfluss nehmen, können so ermittelt werden. Mit Änderungen der Parameter kann damit die Dauer so verändert, dass während der Aufnahme mehr unterschiedliche Farbstoffe in den An-Zustand übergehen.

Um Strukturen im Nanometerbereich aufzulösen, wird normalerweise die Elektronenmikroskopie zur Hilfe genommen (Koster et al. 2003). Mit neuartigen Antikörpern, die einen fluoreszierenden Farbstoff und zusätzlich einen Goldpartikel tragen, kann versucht werden, Abbildungen mit beiden Techniken nacheinander abzubilden. Mit hochauflösender Lichtmikroskopie bietet sich jetzt die Möglichkeit, die Position von einzelnen Antikörpern mit beiden Techniken zu bestimmen und zu vergleichen. Die naturnahen Bedingungen bei der Lichtmikroskopie lassen sich so direkt mit der Hochauflösung eines Elektronenmikroskops verbinden.

Die dSTORM besitzt auch Nachteile, welche in Zukunft teilweise durch eine Verbesserung der Technik wieder kompensiert werden können. Um ein hochaufgelöstes Bild mit der dSTORM zu erhalten, müssen viele Bilder von einer Struktur gemacht werden. Dieses führt zu einer langen Aufnahmezeit, die zwar durch bessere Optik, Kamera usw. beschleunigt werden könnte, aber immer ein Bestandteil dieser Art der Mikroskopie sein wird.

Die Auflösung der dSTORM ist in lateraler Richtung deutlich besser als in axialer Richtung. Die axiale Auflösung einer PSF ist durch ihre große Ausdehnung und ihre Symmetrie sehr schlecht. Durch Einbringen von „Fehlern“ in der Abbildung einer PSF wird versucht, die Genauigkeit der Positionsbestimmungen in der dritten Dimension zu verbessern (Lew et al. 2010).

Um eine genaue Position von fluoreszierenden Farbstoffen zu bestimmen, müssen diese eine sehr gute Quanteneffizienz und ein stabiles Verhalten, z.B. gegen Ausbleichen, zeigen. Organische, fluoreszierende Farbstoffe haben diese Eigenschaften. Das Einbringen von diesen Farbstoffen in Zellen und ihre spezifische Bindung an Strukturen ist einer der limitierenden Faktoren der dSTORM. Verschiedene Möglichkeiten werden zur Zeit erforscht, um hier eine möglichst effiziente und spezifische Kopplung in Zellen zu erreichen (Lin et al. 2008).

5 Literatur

- Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Archiv für mikroskopische Anatomie 9, 413–418. Available at: <http://www.springerlink.com/index/k7154700k345404p.pdf>.
- Allen, E., Yu, Q. C., and Fuchs, E. (1996). Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. The Journal of cell biology 133, 1367–1382. Available at: <http://www.jstor.org/stable/1617443>.
- Amos, L., and Baker, T. (1979). The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. Nature 279, 607. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/450110>.
- Aratyn-Schaus, Y., and Gardel, M. L. (2010). Transient frictional slip between integrin and the ECM in focal adhesions under myosin II tension. Current biology : CB 20, 1145–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2902720&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- August, K. (1893). Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik 10, 433–440. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Ein+neues+Beleuchtungsverfahren+für+mikrophotographische+Zwecke#0>.
- Avvisato, C. L., Yang, X., Shah, S., Hoxter, B., Li, W., Gaynor, R., Pestell, R., Tozeren, A., and Byers, S. W. (2007). Mechanical force modulates global gene expression and β -catenin signaling in colon cancer cells. J Cell Sci 120, 2672–82. Available at: http://bioinformatics.biomed.drexel.edu/CfIB_publications/J_cell_sci_2007.pdf.
- Balaban, N Q et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. Nature cell biology 3, 466–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331874>.
- Ballestrem, C, Hinz, B, Imhof, B. a, and Wehrle-Haller, B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential α V β 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. The Journal of cell biology 155, 1319–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2199321&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Barzik, M., Kotova, T. I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F. B., and Schafer, D. A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. Journal of Biological Chemistry 280, 28653. Available at: <http://www.jbc.org/content/280/31/28653.full>.
- Besser, Achim, and Schwarz, U.S. (2007). Coupling biochemistry and mechanics in cell adhesion: a model for inhomogeneous stress fiber contraction. New Journal of Physics 9, 425. Available at: <http://iopscience.iop.org/1367-2630/9/11/425>.
- Bischofs, I. B., Klein, F., Lehnert, D., Bastmeyer, M., and Schwarz, U.S. (2008). Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape. Biophysical journal 95, 3488–3496. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349508784911>.
- Blagosklonny, M. V., and Fojo, T. (1999). Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). International Journal of Cancer 83, 151–156. Available at: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991008\)83:2%3C151::AID-IJC1%3E3.0.CO;2-5/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0215(19991008)83:2%3C151::AID-IJC1%3E3.0.CO;2-5/full).
- Bretscher, a, and Weber, K. (1980). Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. The Journal of cell biology 86, 335. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/86/1/335.abstract>.
- Burke, R. D. (1999). Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. International review of cytology 191, 257–284. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769608601618>.
- Buxboim, A., Rajagopal, K., Brown, A. E. X., and Discher, D.E. (2010). How deeply cells feel: methods for thin gels. Journal of Physics: Condensed Matter 22, 194116. Available at: <http://iopscience.iop.org/0953-8984/22/19/194116>.
- Cesa, C.M., Kirchgeßner, N., Mayer, D., Schwarz, U.S., Hoffmann, B., and Merkel, R. (2007). Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns. Review of Scientific Instruments 78, 034301. Available at: <http://link.aip.org/link/?rsi/78/034301>.
- Chen, C.S. (2008). Mechanotransduction—a field pulling together. J Cell Sci 121, 3285–3292. Available at: http://www.master-biomed.ethz.ch/education/bio_courses/Mechanobiology/Chen_2008.pdf.

- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., and Ingber, D.E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/276/5317/1425>.
- Chen, G., Hou, Z., Gulbranson, D. R., and Thomson, J. A. (2010). Actin-Myosin Contractility Is Responsible for the Reduced Viability of Dissociated Human Embryonic Stem Cells. *Cell stem cell* 7, 240-248. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682449>.
- Chhabra, E. S., and Higgs, Henry N (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature cell biology* 9, 1110-21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909522>.
- Colombelli, J. et al. (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *Journal of Cell Science* 122, 1928-1928. Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.054577>.
- Coutu, M. D., and Craig, S. W. (1988). cDNA-derived sequence of chicken embryo vinculin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 8535. Available at: <http://www.pnas.org/content/85/22/8535.abstract>.
- Cramer, L. P., Siebert, M., and Mitchison, T. J. (1997). Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *The Journal of cell biology* 136, 1287. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/136/6/1287.full>.
- Dabelsteen, E. (1998). Molecular biological aspects of acquired bullous diseases. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 9, 162. Available at: <http://cro.sagepub.com/content/9/2/162.abstract>.
- Dejana, E., Corada, M., and Lampugnani, M. G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *The FASEB Journal* 9, 910. Available at: <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/9/10/910>.
- Discher, D., Dong, C., Fredberg, J. J., Guilak, F., Ingber, D., Janmey, P., Kamm, R. D., Schmid-Schönbein, G. W., and Weinbaum, S. (2009). Biomechanics: cell research and applications for the next decade. *Annals of biomedical engineering* 37, 847-59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259817>.
- D'arcy, W. T. (1942). *On growth and form*. Cambridge, London. Available at: http://www.sciencemag.org/cgi/issue_pdf/frontmatter_pdf/96/2486.pdf.
- Endlich, N., Otey, C. A., Kriz, W., and Endlich, K. (2007). Movement of stress fibers away from focal adhesions identifies focal adhesions as sites of stress fiber assembly in stationary cells. *Cell motility and the cytoskeleton* 64, 966-76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868136>.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, Dennis E (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923388>.
- Fomovsky, G. M., Thomopoulos, S., and Holmes, J. W. (2010). Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48, 490-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686759>.
- Franke, R. P., Gräfe, M., Schnittler, H., Seiffge, D., Mittermayer, C., and Drenckhahn, D. (1984). Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* 307, 648-649. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/307648a0>.
- Franz, C., and Müller, D. (2005). Analyzing focal adhesion structure by atomic force microscopy. *Journal of cell science* 118, 5315-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263758>.
- Freyman, T. M., Yannas, I. V., Yokoo, R., and Gibson, L. J. (2002). Fibroblast contractile force is independent of the stiffness which resists the contraction. *Experimental cell research* 272, 153-62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777340>.
- Fuchs, E. (2001). Bridging cytoskeletal intersections. *Genes & Development* 15, 1-14. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.861501>.
- Fujii, T., Iwane, A. H., Yanagida, T., and Namba, K. (2010). Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature*, 1-3. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature09372.html>.
- Furukawa, R., and Fechheimer, M. (1997). The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *International review of cytology* 175, 29-90. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769608621257>.
- Fölling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C. A., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2008). Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature methods* 5, 943-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794861>.
- Gabbiani, G., Ryan, G., and Majno, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 27, 549-550. Available at: <http://www.springerlink.com/index/36423852X885K838.pdf>.
- Galbraith, C. G., Yamada, K. M., and Sheetz, M. P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *The Journal of cell biology* 159, 695-705. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2173098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Geiger, Benjamin, Spatz, Joachim P, and Bershadsky, Alexander D (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 21-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197329>.
- Geiger, Benjamin, Tokuyasu, K. T., Dutton, A. H., and Singer, S. J. (1980). Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 4127-31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=349783&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Giancotti, F. G. (1999). Integrin Signaling. *Science* 285, 1028-1033. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5430.1028>.
- Goldmann, W. H., and Ingber, Donald E (2002). Intact vinculin protein is required for control of cell shape, cell mechanics, and rac-dependent lamellipodia formation. *Biochemical and biophysical research communications* 290, 749-55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785963>.
- Goldstein, S. a, Wilson, D. L., Sonstegard, D. a, and Matthews, L. S. (1983). The mechanical properties of human tibial trabecular bone as a function of metaphyseal location. *Journal of biomechanics* 16, 965-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6671987>.
- Goldyn, A. M., Rioja, B. A., Spatz, Joachim P, Ballestrem, Christoph, and Kemkemer, R. (2009). Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding. *Journal of cell science* 122, 3644-51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812308>.
- Goldys, E. M. (2009). *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences* (Blackwell Pub) Available at: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=4Lu_Fsspx9YC&oi=fnd&pg=PR15&dq=Fluorescence+applications+in+biotechnology+and+life+sciences&ots=D8eXykr0W7&sig=Cc3UWKJMyGI8cEbl8KFKLJ8OAv8.
- Halbrügge, M., and Walter, U. (1989). Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *European journal of biochemistry / FEBS* 185, 41-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2806262>.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A., others (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70. Available at: <http://www.citeulike.org/user/corlisswain/article/710800>.
- Hecht, E. (2002). *Optik* (4 Auflage).
- Heil, P., and Spatz, Joachim P (2010). Lateral shear forces applied to cells with single elastic micropillars to influence focal adhesion dynamics. *Journal of Physics: Condensed Matter* 22, 194108. Available at: <http://stacks.iop.org/0953-8984/22/i=19/a=194108?key=crossref.0c54c66c574b059ca6109025db8998cb>.
- Heilemann, M., De Linde, S. van, Mukherjee, A., and Sauer, M. (2009). Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48, 6903-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19670280>.
- Hinz, Boris (2010). The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of biomechanics* 43, 146-55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800625>.
- Hinz, Boris, Mastrangelo, D., Iselin, C. E., Chaponnier, C., and Gabbiani, Giulio (2001). Mechanical Tension Controls Granulation Tissue Contractile Activity and Myofibroblast Differentiation. *Cell* 159, 1009-1020.
- Horbett, T. A., and Brash, J. L. (1987). Proteins at interfaces: current issues and future prospects. *Proteins at interfaces: physiochemical and biochemical studies*. Washington, DC: American Chemical Society, 1–33. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1987-0343.ch001>.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology* 173, 383-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651381>.
- Hu, K., Ji, L., Applegate, K. T., Danuser, G., and Waterman-Storer, C. M. (2007). Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science (New York, N.Y.)* 315, 111-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204653>.
- Huang, Sui, and Ingber, Donald E (2005). Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer cell* 8, 175-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169461>.
- Hynes, Richard O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, 673-687. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402009716>.
- Ingber, Donald E (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 811-27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675838>.
- Izzard, C., and Lochner, L. R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *Journal of cell science* 21, 129. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/932106>.

- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., and Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 468, 580–584. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v468/n7323/abs/nature09621.html>.
- Kaunas, R., Usami, S., and Chien, S. (2006). Regulation of stretch-induced JNK activation by stress fiber orientation. *Cellular signalling* 18, 1924–1931. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656806000453>.
- Kim, D. W., Gotlieb, A. I., and Langille, B. L. (1989). In vivo modulation of endothelial F-actin microfilaments by experimental alterations in shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 9, 439. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/abstract/9/4/439>.
- Koster, A. J., and Klumperman, J. (2003). Electron microscopy in cell biology: integrating structure and function. *Nature reviews. Molecular cell biology Suppl*, SS6-10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14587520>.
- Kreis, T., and Birchmeier, W. (1980). Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 22, 555–561. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867480903657>.
- Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P. H., Käfer, J., Graner, F., Müller, D. J., and Heisenberg, C. P. (2008). Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nature cell biology* 10, 429-36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364700>.
- Kumar, S., Maxwell, I. Z., Heisterkamp, A., Polte, T. R., Lele, T. P., Salanga, M., Mazur, E., and Ingber, Donald E (2006). Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophysical journal* 90, 3762-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500961>.
- Langanger, G., Moeremans, M., Daneels, G., Sobieszek, A., De Brabander, M., and De Mey, J. (1986). The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells. *The Journal of cell biology* 102, 200-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2114045&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359–370. Available at: [http://www.cell.com/structure/redirectUrl/biophysj/abstract/S0006-3495\(94\)80502-8](http://www.cell.com/structure/redirectUrl/biophysj/abstract/S0006-3495(94)80502-8).
- Lazarides, E., and Burridge, K (1975). α -Actinin: Immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell* 6, 289-298. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867475901804>.
- Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602996>.
- Lew, M. D., Thompson, M. A., Badieirostami, M., and Moerner, W. E. (2010). In vivo Three-Dimensional Superresolution Fluorescence Tracking using a Double-Helix Point Spread Function. *Proceedings - Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers* 7571, 75710Z. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20563317>.
- Lin, M. Z., and Wang, L. (2008). Selective labeling of proteins with chemical probes in living cells. *Physiology (Bethesda, Md.)* 23, 131-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556466>.
- Lu, L., Oswald, S. J., Ngu, H., and Yin, F. C.-P. (2008). Mechanical properties of actin stress fibers in living cells. *Biophysical journal* 95, 6060-71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820238>.
- Lukashev, M. E., and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology* 8, 437-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9854310>.
- Manstein, D. J., Ruppel, K. M., and Spudich, J. A. (1989). Expression and characterization of a functional myosin head fragment in Dictyostelium discoideum. *Science (New York, N.Y.)* 246, 656-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2530629>.
- Matthews, B. D., Overby, D. R., Mannix, R., and Ingber, Donald E (2006). Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *Journal of cell science* 119, 508-18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443749>.
- Merkel, R., Kirchgessner, N., Cesa, Claudia M, and Hoffmann, B. (2007). Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness. *Biophysical journal* 93, 3314-23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2025665&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mizutani, T., Haga, H., and Kawabata, K. (2004). Cellular stiffness response to external deformation: tensional homeostasis in a single fibroblast. *Cell motility and the cytoskeleton* 59, 242-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15493061>.
- Mosher, D. F., and Furcht, L. T. (1981). Fibronectin: Review of its Structure and Possible Functions. *Journal of Investigative Dermatology* 77, 175-180. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1111/1523-1747.ep12479791>.

- Mousa, S. a (2008). Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications. *Molecular biotechnology* 38, 33-40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18095189>.
- Möhl, C., Kirchgessner, N., Schäfer, C., Küpper, K., Born, S., Diez, G., Goldmann, W. H., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2009). Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell motility and the cytoskeleton* 66, 350-64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422016>.
- Ochsner, M., Textor, M., Vogel, V., and Smith, M. L. (2010). Dimensionality controls cytoskeleton assembly and metabolism of fibroblast cells in response to rigidity and shape. *PloS one* 5, e9445. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2843632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ono, S. (2010). Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle. *Cytoskeleton* (Hoboken, N.J.) 67, 677-92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2963174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Parker, R. C. (1981). Cellular Homologue (c-src) of the Transforming Gene of Rous Sarcoma Virus: Isolation, Mapping, and Transcriptional Analysis of c-src and Flanking Regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 5842-5846. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.9.5842>.
- Patla, I., Volberg, T., Elad, N., Hiershfeld-Warneken, V., Grashoff, C., Fässler, R., Spatz, Joachim P, Geiger, Benjamin, and Medalia, O. (2010). Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nature cell biology* 12, 909-915. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694000>.
- Pellegrin, S., and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of cell science* 120, 3491-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928305>.
- Peterson, L. J., Rajfur, Z., Maddox, A. S., Freel, C. D., Chen, Yun, Edlund, M., Otey, C., and Burridge, Keith (2004). Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Molecular biology of the cell* 15, 3497-508. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry* 275, 21785-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801897>.
- Price, C. J., and Brindle, N. P. (2000). Vasodilator-stimulated phosphoprotein is involved in stress-fiber and membrane ruffle formation in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 2051-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978248>.
- Riveline, Daniel, Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, Benjamin, and Bershadsky, A.D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *Science's STKE* 153, 1175. Available at: http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/vj_jcb;153/6/1175.
- Saez, A., Buguin, A., Silberzan, P., and Ladoux, B. (2005). Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophysical journal* 89, L52-4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1367004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sanger, J. W., Sanger, J. M., and Jockusch, B. M. (1983). Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. *The Journal of cell biology* 96, 961-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sawada, Y., and Sheetz, M. P. (2002). Force transduction by Triton cytoskeletons. *The Journal of cell biology* 156, 609-15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M. P. (2006). Force Sensing by Extension of the Src Family Kinase Substrate, p130Cas. 127, 1015-1026.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology* 190, 165-175. Available at: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201002018>.
- Schütze, J., Skorokhod, A., Müller, I. M., and Müller, W. E. (2001). Molecular evolution of the metazoan extracellular matrix: cloning and expression of structural proteins from the demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *Journal of molecular evolution* 53, 402-15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675600>.
- Selhuber-Unkel, C., Erdmann, T., López-García, M., Kessler, H., Schwarz, U S, and Spatz, J P (2010). Cell adhesion strength is controlled by intermolecular spacing of adhesion receptors. *Biophysical journal* 98,

- 543-51. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2820634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Senda, T., Iizuka-Kogo, A., and Shimomura, A. (2005). Visualization of the nuclear lamina in mouse anterior pituitary cells and immunocytochemical detection of lamin A/C by quick-freeze freeze-substitution electron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53, 497-507. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805424>.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 22, 1567-72. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558047>.
- Sharp, A. A., Ortega, A. M., Restrepo, D., Curran-Everett, D., and Gall, K. (2009). In Vivo Penetration Mechanics and Mechanical Properties of Mouse Brain Tissue at Micrometer Scales. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 56, 45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855535/>.
- Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A., and Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nature methods* 5, 417-23. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18408726>.
- Singer (1982). Association of fibronectin and vinculin with focal contacts and stress fibers in stationary hamster fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 92, 398-408. Available at:
<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.92.2.398>.
- Skarp, K.-P., and Vartiainen, M. K. (2010). Actin on DNA-an ancient and dynamic relationship. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67, 487-95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593452>.
- Small (1998). Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochimica et biophysica acta* 1404, 271-81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9739149>.
- Smilenov, L. B., Mikhailov, a, Pelham, R. J., Marcantonio, E. E., and Gundersen, G. G. (1999). Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)* 286, 1172-4. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10550057>.
- Smith, M. L., Gourdon, D., Little, W. C., Kubow, K. E., Eguiluz, R. A., Luna-Morris, S., and Vogel, V. (2007). Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS biology* 5, e268. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914904>.
- Steinhauer, C., Forthmann, C., Vogelsang, J., and Tinnefeld, P. (2008). Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states. *Journal of the American Chemical Society* 130, 16840-1. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053449>.
- Stewart, P. L., and Nemerow, G. R. (2007). Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends in microbiology* 15, 500-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988871>.
- Stricker, J., Falzone, T., and Gardel, M. L. (2010). Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *Journal of biomechanics* 43, 9-14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913792>.
- Svitkina, T. M., Surguchova, I. G., Verkhovsky, A. B., Gelfand, V. I., Moeremans, M., and De Mey, J. (1989). Direct visualization of bipolar myosin filaments in stress fibers of cultured fibroblasts. *Cell motility and the cytoskeleton* 12, 150-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2653646>.
- Tamkun, J. W., DeSimone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A F, and Hynes, R O (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46, 271-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3487386>.
- Tan, J. L., Tien, J., Pirone, D. M., Gray, D. S., Bhadriraju, K., and Chen, Christopher S (2003). Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1484-9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12552122>.
- Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical journal* 82, 2775-2783. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634950275618X>.
- Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Yong, and Bornens, M. (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeleton* 63, 341-55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550544>.
- Théry, M., Racine, V., Piel, M., Pépin, A., Dimitrov, A., Chen, Yong, Sibarita, J.-B., and Bornens, M. (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19771-6. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1750916&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Tomasek, J. J., Gabbiani, Giulio, Hinz, Boris, Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 349-63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988769>.
- Vakonakis, I., and Campbell, I. D. (2007). Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Current opinion in cell biology* 19, 578-83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942296>.
- Vallee, R. B., and Shpetner, H. S. (1990). Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annual review of biochemistry* 59, 909-32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2142876>.
- Vincenti, M. P., and Brinckerhoff, C. E. (2007). Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *Journal of cellular physiology* 213, 355-64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17654499>.
- Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., and Tinnefeld, P. (2008). A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 47, 5465-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18601270>.
- Vogelsang, J., Steinhauer, C., Forthmann, C., Stein, I. H., Person-Skegro, B., Cordes, T., and Tinnefeld, P. (2010). Make them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 11, 2475-90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20632356>.
- Wang, J., Chen, H., Seth, A., and McCulloch, C. A. (2003). Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285, H1871-81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842814>.
- Warren, L., and Margaret, L. (1924). *General Cytology Behavior of Cells in Tissue Cultures*.
- Weber, K., and Groeschel-Stewart, U. (1974). Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 4561-4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=433927&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wedekind, P., Kubitscheck, U., and Peters, R. (1994). Scanning microphotolysis: a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser beam and confocal imaging. *Journal of microscopy* 176, 23-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7799426>.
- Yamada, M., Kurihara, H., Kinoshita, K., and Sakai, T. (2005). Temporal expression of alpha-smooth muscle actin and drebrin in septal interstitial cells during alveolar maturation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53, 735-44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928322>.
- Yildiz, A., and Selvin, P. R. (2005). Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: application to molecular motors. *Accounts of chemical research* 38, 574-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16028892>.
- Yoshigi, M., Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Yost, H. J., and Beckerle, M. C. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of cell biology* 171, 209-15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247023>.
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., and Geiger, Benjamin (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions* 32, 416-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157150>.
- Zand, M. S., and Albrecht-Buehler, G. (1989). What structures, besides adhesions, prevent spread cells from rounding up? *Cell motility and the cytoskeleton* 13, 195-211. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2505936>.

Es gibt viele Dinge zu tun in zu wenig Zeit. Wir sind alle
überarbeitet und überanstrengt. Ohne Schlaf wirst Du
allmählich dumm
„Philip Roth“

Danksagung

Danke, Professor Merkel, für die Möglichkeit in Ihrem Institut diese Arbeit anzufertigen. Mit guter Führung konnte ich eigene Wege gehen. Danke, für Ihre Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Professor Kubitschek danke ich für die Übernahme des Koreferates und für den kritischen Blick von Außen auf meine Arbeit.

Danke, Bernd Hoffmann, für die erfolgreiche Zusammenarbeit und das immerwährende Antreiben und Steuern, um schneller und besser ans Ziel zu kommen.

Danke, an die Arbeitsgruppe von B. Geiger, die freundlicher Weise GFP-Vinculin und -Aktin zur Verfügung gestellt haben. Danke, an das Weizmann Institut für einen tollen Workshop.

Danke, an die Arbeitsgruppe von J. Wehland (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Deutschland) für das GFP-VASP Konstrukt.

Danke, an alle Korrektoren dieser Arbeit, vor allem für die sprachlichen Verbesserungen.

Danke, an Inka, die geholfen hat aus einem Zustand vollständiger Unordnung oder Verwirrung etwas zu formen, was für Andere logische Ordnung, von zusammenwirkenden Elementen, darstellt. Ich liebe Dich!

Danke, an Thorsten, der wissenschaftlich immer den Finger genau in die Wunde legen kann, was aber eine wissenschaftliche Arbeit durch Vermeidung des Schmerzes sehr verbessert. Danke, an meine Schwester Chrissi. Durch ihren unbeschreiblich großen Aufwand, wurde auch noch das letzte Komma gesetzt. ;-) Ich werde mir jetzt auch mal selber, eine oder mehrere Tüten davon zulegen. Danke, Onkel Rainer, dem ich hiermit verspreche mit ihm im nächsten Jahr ein Haus zu bauen (zumindest Hilfe anzubieten) ☺.

Danke an Ulla, durch die alles erst ermöglicht wurde.

Danke an Norbert Kirchgeßner und Sebastian Houben für unzählige Funktionen, die aus unserer „matlib“ ein mächtiges Werkzeug macht. Danke, dass ihr mir Dinge erklärt habt, die mich ehrlich gesagt einige Male zum Staunen, sei es aus Irritation oder Verehrung, gebracht haben.

Danke, Simone, für viele neue Fusionsproteine und den weiter unermüdlichen Kampf gegen mein und das allgemeine Chaos.

Danke, Nils, für die Einführung in die Welt der Isolation von Zellen aus kleinen Ratten-Embryoherzen. Du bist 'ne Allzweckwaffe und ein super Typ.

Danke, Nico, für die Siliziumscheiben, intern auch gern mal Wafer genannt ☺ , für die PDMS-Kalibrierung und dafür, dass Du mich und meine Unordnung so stillschweigend erträgst. Werde fleißig sein und weiter versuchen mit Dir die Frage zu klären, „Was die Welt im Innersten zusammenhält.“

Thanks to Thomas and Jonny. Nice setup! Thank you for the terrific teamwork. Let's hope for promising results in the future.

Danke an die Leute aus der Werkstatt und der IT. Die Kompetenz, Schnelligkeit und Präzision haben hier die Grundlage allen Erfolges im Labor geschaffen. Viele Probleme kann man nur lösen, wenn man weiß, was man tut. Danke

Danke, an Wolfgang für die technische Hilfe und Ideen bei der Arbeit und dafür dass er viele Tätigkeiten im Hintergrund erledigt. Mit seinen unnachahmlichen Stimmungen ist er echt eine Bereicherung gewesen.

Danke, an unseren Facility Manager Herrn Schmitz. Ich wünsche mir immer noch, dass sich meine Ordnung Ihrer annähert. Respekt!

Danke, an alle, die mich auf dem Weg begleitet, beobachtet und umgeben haben. Eine Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Überwinden der geistigen und emotionalen Erschöpfung liegt im harmonischen Zusammenleben.

In diesem Sinne

Alles wird gut

David 2011